

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: 89100482.2

51 Int. Cl.⁴: C12Q 1/68 , C07H 21/00

22 Anmeldetag: 12.01.89

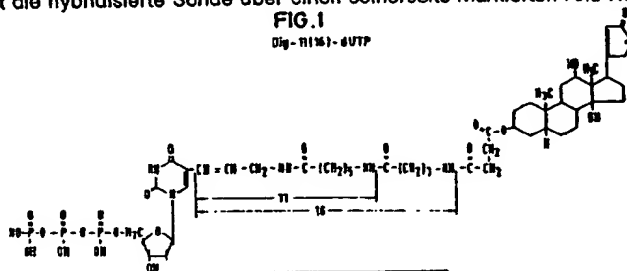
30 Priorität: 12.01.88 DE 3800642
 20.04.88 DE 3813278
 33 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
 19.07.89 Patentblatt 89/29
 64 Benannte Vertragsstaaten:
 AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GmbH
 Sandhofer Strasse 112-132
 D-6800 Mannheim Waldhof(DE)
 72 Erfinder: Hötke, Hans Joachim, Dr. rer.nat.
 Kirchenstrasse 1
 D-8132 Tutzing(DE)
 Erfinder: Seibl, Rudolf, Dr. rer.nat.
 Saalangerstrasse 48
 D-8122 Penzberg(DE)
 Erfinder: Schmitz, Gudrun, Dr. rer.nat.
 Wettersteinstrasse 3
 D-8139 Bernried(DE)
 Erfinder: Schöler, Hans Robert, Dr. rer.nat.
 Lotzestrasse 40
 D-3400 Göttingen(DE)
 Erfinder: Kessler, Christop, Dr. rer.nat.
 Fraunhofer Strasse 12
 D-8000 München 5(DE)
 Erfinder: Mattes, Ralf, Prof. Dr. rer.nat.
 Friedrich-Zundel-Strasse 14
 D-7000 Stuttgart 75(DE)
 74 Vertreter: Huber, Bernhard, Dipl.-Chem. et al
 Möhlstrasse 22 Postfach 860 820
 D-8000 München 86(DE)

54 Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren.

57 Zum Nachweis von Nukleinsäuren definierter Sequenz durch Hybridisierung mit einer komplementären Nukleinsäure-Sonde, die über eine chemische Verbindung mindestens ein Hapten als Markierung gebunden enthält, verwendet man als Hapten ein Steroid, das an mindestens eine Position der Nukleinsäure-Sonde, die nicht an der Wasserstoffbrückenbildung beteiligt ist, über eine Brücke von mindestens 4 Atomen Länge gebunden ist und weist die hybridisierte Sonde über einen seinerseits markierten Anti-Hapten-Antikörper nach.

FIG.1
 Dig-n(16)-dUTP



Xerox Copy Centre

Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren definierter Sequenz durch Hybridisierung mit einer komplementären, markierten Nukleinsäure-Sonde.

Eine der meist angewandten molekular-biologischen Techniken ist die DNA/DNA-, RNA/RNA- bzw. RNA/DNA-Hybridisierung zum Nachweis homologer Nukleinsäure-Sequenzen. Dabei wird eine als Sonde verwendete Nukleinsäure (DNA oder RNA) markiert und mit einer meist auf einem Filter fixierten, zu untersuchenden Nukleinsäure (DNA oder RNA) unter Hybridisierungsbedingungen in Kontakt gebracht. Bei vorhandener Homologie zwischen der als Sonde verwendeten Nukleinsäure und der nachzuweisenden Nukleinsäure kommt es sodann zur Hybridisierung der jeweils komplementären Nukleinsäure-Einzelstränge unter Ausbildung eines Hybrid-Doppelstranges. Anschließend werden die Hybride nachgewiesen. Bisher erfolgte die Markierung der Sonde meist durch Einbau radioaktiv derivatisierter Desoxyribonukleosidtriphosphate. Der Nachweis der Hybride erfolgte dann durch Autoradiographie. Solche konventionellen, radioaktiv markierten DNA-Sonden sind sehr effektiv und sensitiv, es ergeben sich jedoch durch den Umgang mit der Radioaktivität Probleme. So wird zum Umgang mit den radioaktiven Verbindungen speziell ausgebildetes Personal benötigt, da bei unsachgemäßer Handhabung eine Gefährdung der Laborsicherheit besteht. Außerdem bildet die Entsorgung der radioaktiven Verbindungen ein weiteres Problem. Zusätzlich sind die radioaktiv markierten Proben aufgrund der Halbwertszeit der verwendeten radioaktiven Materialien nur über einen gewissen Zeitraum nach der Herstellung verwendbar. Auch kann bei der Detektion von geringen Mengen von nachzuweisender DNA die nötige Belichtungszeit der Autoradiographie sehr lange, nämlich Tage bis Wochen sein.

Neben den radioaktiv markierten Systemen zum Nachweis von Nukleinsäuren sind nicht-radioaktive Methoden bekannt, wobei die verwendeten Nukleinsäure-Proben mit Biotin-Molekülen (US-PS 2 915 082, EP-A 0063879) Digoxin-/T3-/T4-Molekülen (EP-A-O 173251) oder mit Alkyl-/Butyl-/Ethyl-/Sulfonsäure-/Nitrosomolekülen EP-A 128018) modifiziert sind. Der Einbau dieser niedermolekularen Nachweismoleküle in die komplementäre Nukleinsäure-Sonde erfolgt dabei chemisch, photochemisch oder enzymatisch. Sodann erfolgt die Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz. Der Nachweis der Hybride erfolgt dann über Bindung des niedermolekularen Moleküls durch ein (Strept)-Avidin-Markerenzym-Konjugat im Fall von Biotin, Antidigoxin-/T3-/T4-Antikörper-Markerenzym-Konjugate im Fall von Digoxin-/T3-/T4-Molekülen oder über Anti-Alkyl-/Butyl-/Ethyl-/Sulfonsäure-/Nitroso-Antikörper-Markerenzym-Konjugate. Der Nachweis des Hybridisierungsproduktes erfolgt durch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Markerenzyms über gekoppelte Farbstoffsysteme. Bei der Methode der EP-A-O 173 251 erfolgt jedoch die Bindung der Digoxin/T3-/T4-Moleküle an ein an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligtes N-Atom einer oder mehrerer Basen der Nukleinsäuresonde, wodurch die Hybridisierung - vor allem bei Mehrfachmodifizierung der Sonde - mit der nachzuweisenden Nukleinsäure beeinträchtigt sein kann. Mit Ausnahme des Biotin/(Strept)-Avidin-System ist die Sensitivität der derzeit bekannten, nicht-radioaktiven Systeme, im Vergleich mit radioaktiven Systemen, jedoch um mindestens den Faktor 10 bis 100 vermindert. Die bisher einmalig hohe Sensitivität des nicht-radioaktiven Nachweises auf Biotin/(Strept)-Avidin-Basis ist auf die hohe Bindungskonstante ($K = 10^{15} \text{ Mol}^{-1}$) speziell des Biotin/(Strept)-Avidin-Systems zurückzuführen (Lit. Know; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 4045). Die maximal erreichbare Sensitivität des Biotin/(Strept)-Avidin-Systems liegt wie auch bei radioaktiver Markierung im Nachweis von 1 pg bis 0,1 pg DNA im Dot-Blot, und im Nachweis von "single-copy" Genen, das heißt von nur einmal im Genom vorkommenden Genen, im genomischen Blot bei Verwendung von 10 bis 1 µg genomischer DNA-Fragmente. Die Ausnützung der Biotin/(Strept)-Avidin-Wechselwirkung hat jedoch den entscheidenden Nachteil, daß sie sehr störanfällig ist, da das Vitamin Biotin in nahezu allen biologischen Materialien vorkommt (Biochem. Biophys. Acta 29 (1985) 225; Biochem. Biophys. Acta 41 (1960) 122).

Die Aufgabe der Erfindung bestand daher darin, ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren bereitzustellen, das die Verwendung einer nicht radioaktiven Markierung erlaubt und weniger störanfällig als die Biotin/(Strept)-Avidin-Wechselwirkung ist, andererseits jedoch die bisher einzigartig hohe Nachweis-Sensitivität der radioaktiven Markierung bzw. der Biotin/(Strept)-Avidin-Markierung erreicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren definierter Sequenz durch Hybridisierung mit einer komplementären Nukleinsäuresonde, die über eine chemische Verbindung mindestens ein Hapten als Markierung gebunden enthält, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man als Hapten ein Steroid verwendet, das an mindestens eine Position der Nukleinsäure, die nicht an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist, über eine Brücke von mindestens 4 Atomen Länge gebunden ist und die hybridisierte Probe über einen seinerseits markierten Anti-Hapten-Antikörper nachweist.

Bevorzugt werden hierbei als Steroid Digoxigenin oder Digoxin verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den Nachweis von 0,5 pg bis 0,05 pg homologer DNA im Dot-Blot und von "single copy"-Genen in 5 µg bis 0,5 µg genomischen DNA-Fragmenten. In beiden Nachweisarten ist die Nachweissensitivität mindestens analog der Nachweissensitivität des Biotin/(Strept)-Avidin-Systems. Dies ist insofern überraschend, da die Bindungskonstante der Biotin/(Strept)-Avidin-Wechselwirkung ($K = 10^{15} \text{ Mol}^{-1}$, Green, N.M. (1975) Adv. Protein Chem. 29, 85-133; Chalet, L., Wolf, F.J. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 106, 1-5) um mindestens den Faktor 10^5 höher ist als die Wechselwirkung von Digoxigenin oder Digoxin mit dem entsprechenden Antikörper ($K = 2 \times 10^8 \text{ Mol}^{-1} - 7 \times 10^9 \text{ Mol}^{-1}$, Hunter et al., J. Immunol. Vol. 129, Nr. 3 (1982) 1165), und zusätzlich die Biotin/(Strept)-Avidin-Wechselwirkung durch das Vorhandensein von 4 Biotin-Bindungsstellen auf (Strept)-Avidin begünstigt ist.

Ein weiterer überraschender technischer Vorteil ist, daß bei Verwendung von Digoxigenin oder Digoxin und den dazugehörigen Antikörpern sehr viel weniger unspezifische Bindung (background) an den Filter, auf welchem die nachzuweisende Nukleinsäure fixiert ist, entsteht, als bei Verwendung von Biotin/(Strept)-Avidin.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von Nukleinsäuren läßt sich in drei Schritte aufgliedern.

1. Die Derivatisierung der als Nachweisreagenz dienenden Nukleinsäure-Probe mit dem Hapten,
2. die Hybridisierung, und
3. die Detektion der Hybride.

Zur Derivatisierung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) können verschiedene Methoden angewendet werden (Molecular Cloning, Maniatis et al., (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Der Einbau des Haptens kann hierbei enzymatisch, chemisch oder photochemisch erfolgen.

In der "Random-primed" Methode (Anal. Biochem. 132 (1983) 6) werden doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure-Sonden zunächst denaturiert, d.h. die beiden Stränge werden durch Erhitzen getrennt und dadurch in Nukleinsäure-Einzelstränge überführt. Bei einzelsträngigen Desoxyribonukleinsäure-Sonden entfällt die Denaturierung. An die Desoxyribonukleinsäure-Einzelstränge werden sogenannte "Random Primer", das sind beliebige kurze Oligo-Desoxyribonukleotide mit unterschiedlichen Sequenzen, die mit komplementären Sequenzabschnitten der Einzelstrang-DNA hybridisieren, gebunden. Anschließend wird ausgehend von den 3'-OH-Enden der "Random Primern" durch Einwirkung des Enzyms Klenow Polymerase oder anderer DNA-Polymerasen (z.B. Phage T4 oder T7-kodiert oder aus *Thermus aquaticus*) der zum Einzelstrang komplementäre Strang synthetisiert. Dabei werden die als Substrat angebotenen vier Desoxyribonukleosidtriphosphat-Arten eingebaut. Bis zu vier dieser Triphosphat-Arten sind teilweise oder gänzlich durch Kopplung eines Steroids über eine Brücke derivatisiert, so daß bei der Desoxyribonukleinsäure-Synthese dieses Steroid mit eingebaut wird. Ein bevorzugtes, Steroid-derivatisiertes Nukleosidtriphosphat ist in der Fig. 1 mit zwei verschiedenen bevorzugten Brückenkettenlängen dargestellt.

In der "Specific-primed" Methode werden anstelle von "Random Primern", also kurzen Oligo-Desoxyribonukleotiden mit unterschiedlichsten Sequenzen, "Specific Primer", also Oligo-Desoxyribonukleotide mit spezifischen Sequenzen, verwendet. Diese spezifischen Primer binden einheitlich nur an den komplementären Sequenzabschnitt der Einzelstrang-DNA. Die Synthese des komplementären Stranges wird im Gegensatz zur "Random-primer"-Methode nur von diesem bestimmten Sequenzabschnitt gestartet. Es werden die als Substrat angebotenen vier Desoxyribonukleosidtriphosphat-Arten eingebaut. Bis zu vier dieser Triphosphat-Arten sind teilweise oder gänzlich durch Kopplung eines Steroids über eine Brücke derivatisiert, so daß bei der Desoxyribonukleinsäure-Synthese dieses Steroid mit eingebaut wird.

Bei der "Reversen Transkriptions" Methode (Efstratiadis, A.F.C., Villa-Komaroff, L. (1979) Genetic Engineering (Stelow, J.K. and Hollaender, A., eds.) Plenum Press, New York and London, Vol. 1, pp. 1) werden einzelsträngige Ribonukleinsäure-Sonden oder doppelsträngige Ribonukleinsäure-Sonden nach Denaturierung, d.h. Überführung in Einzelstränge, retrotranskribiert, d.h. die entsprechende Desoxyribonukleinsäure gebildet. Hierzu werden an die einzelsträngigen Ribonukleinsäure-Sonden Oligo-Desoxyribonukleotide, die "Primer", an den komplementären Sequenzabschnitt gebunden. Anschließend wird, ausgehend von dem 3'-OH-Ende des gebundenen "Primers" durch Einwirkung des Enzyms Reverse Transkriptase der zum RNA-Einzelstrang komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Als Reverse Transkriptasen werden z.B. Virus AMV oder Mo-MLV kodierte Enzyme verwendet. Bei der DNA-Strangsynthese werden die als Substrat angebotenen vier Desoxyribonukleosidtriphosphat-Arten eingebaut. Bis zu vier dieser Triphosphat-Arten sind teilweise oder gänzlich durch Kopplung eines Steroids über eine Brücke derivatisiert, so daß bei der DNA-Synthese dieses Steroid mit eingebaut wird.

In der "Fill-In" Methode werden doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure-Sonden mit 5'-überhängenden Einzelstrang-Enden derivatisiert. Dazu werden mit dem Enzym Klenow Polymerase oder anderer DNA-

Polymerasen (z.B. Phage T4- oder T7- codiert) die 3'-OH Enden des nicht-überstehenden Einzelstrangs komplementär zu der 5'-überhängenden Einzelstrang-Sequenz verlängert. Dabei werden, je nach Sequenz des 5'-überhängenden Einzelstrang-Bereichs, bis zu vier der angebotenen Desoxyribonukleosidtriphosphat-Arten eingebaut. Bis zu vier dieser Triphosphat-Arten sind wiederum teilweise oder gänzlich durch

5 Kopplung eines Steroids über eine Brücke derivatisiert, so daß bei dem Einbau der Nukleotide dieses Steroid mit eingebaut wird.

In der "Nick-Translation" Methode (J. Mol. Biol. 113 (1977) 237) werden doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure-Sonden gleichzeitig mit dem Enzym *E. coli* DNA Polymerase I sowie einer kleinen Menge des Enzyms DNase I in Anwesenheit der als Substrat dienenden vier Desoxyribonukleosidtriphosphate inkubiert. Durch das Enzym DNase I werden Einzelstrang-Brüche, die sogenannten "nicks", erzeugt. Dadurch entstehen 5'- und 3'-Enden innerhalb des gebrochenen Einzelstranges. Durch das Enzym *E. coli* DNA Polymerase I werden anschließend an den internen Einzelstrang-Brüchen die 5'-endständigen Desoxyribonukleoside abgebaut, gleichzeitig jedoch an das benachbarte freie 3'-OH-Ende eines der als Substrat angebotenen Desoxyribonukleotid-Arten eingebaut. Durch wiederholtes Ablaufen des gleichzeitigen

10 Ab- und Neu-Einbaus eines Nukleotids wandert der Einzelstrang-Bruch in Richtung 3'-Ende. Bis zu vier der als Substrat angebotenen Triphosphat-Arten sind wiederum teilweise oder gänzlich durch Kopplung eines Steroids über eine Brücke derivatisiert, so daß beim Neueinbau der Nukleotide dieses Steroid mit eingebaut wird.

In der "Tailing" Methode wird an 3'-OH-Enden von doppel- oder einzelsträngigen Desoxyribo- oder

20 Ribonukleinsäure-Sonden mit dem Enzym Terminale Transferase in Anwesenheit mindestens einer Art der als Substrat dienenden Desoxyribonukleosidtriphosphate, Dideoxyribonukleosidtriphosphate oder Ribonukleosidtriphosphate mindestens eines dieser Nukleotide angehängt. Die verwendete Art der Triphosphate ist wiederum teilweise oder gänzlich durch Kopplung eines Steroids über eine Brücke derivatisiert, so daß bei dem Einbau der Nukleotide dieses Steroid mit eingebaut wird.

Bei der Phagen-RNA-Polymerase-katalysierten "Transkriptions"-Methode (J. Mol. Biol. 166 (1983) 477) wird während der Desoxyribonukleinsäure-abhängigen Ribonukleinsäure-Synthese die gebildete Ribonukleinsäure derivatisiert. Als Phagen-codierte RNA-Polymerasen werden z.B. Phage SP6-, T7- oder T3-codierte Enzyme verwendet. Für diese Methode werden doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren verwendet, die z.B. SP6-, T7- oder T3-Promotoren enthalten. Durch Zugabe von z.B. SP6-, T7- oder T3-RNA

30 Polymerase und aller vier Arten der Ribonukleosid-Triphosphate wird, ausgehend vom homologen Promotor, der zur codogenen Desoxyribonukleinsäure komplementäre Ribonukleinsäure-Strang, das Transkript, gebildet. Dabei werden die als Substrat angebotenen Ribonukleosidtriphosphat-Arten eingebaut. Bis zu vier dieser Triphosphat-Arten sind teilweise oder gänzlich durch Kopplung eines Steroids über eine Brücke derivatisiert, so daß bei der Ribonukleinsäure-Synthese dieses Steroid mit eingebaut wird.

35 In der "photochemischen" Methode (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 745-761) wird die Nukleinsäure-Sonde in Gegenwart von Photo-Digoxigenin (Fig. 2) mit sichtbarem Licht mit UV-Anteil bestrahlt. Unter Abspaltung von Stickstoff (N_2) entsteht ein Nitrenradikal, das kovalent an die Nukleinsäure bindet.

Für die "chemische" Methode werden im Rahmen der Oligo-Desoxyribonukleotidsynthese nach der Phosphit-Triester-Methode neben den geschützten Nukleosid-phosphoramiditen (dA/dG/dC/dT) geschützte,

40 mit substituierbaren Aminofunktionen modifizierte Nukleosid-phosphoramidite (dA/dG/dC/dU) zum gezielten Einbau in den Oligo-Desoxyribonukleotid-Einzelstrang verwendet. Die Modifizierung von dC/dU geschieht bevorzugt in Position 5 des Pyrimidin-Ringes, die von dA/dG bevorzugt an Position 8 des Purinmoleküls.

Nach Abschluß der Syntheseyklen und Entfernung der Schutzgruppen resultieren einzelsträngige, an den Nukleobasen mit substituierbaren Aminofunktionen modifizierte Oligo-Desoxyribonukleotide, die mit geeigneten Haptenen markierbar sind. Solche Haptene sind Steroide, bevorzugt Digoxigenin, Digoxin, d.h. die Markierung geschieht durch Umsetzung des Oligo-Desoxyribonukleotides mit den entsprechenden

45 aktivierten Estern, Amiden oder Ethern der Haptene, vorzugsweise ihren N-hydroxysuccinimidestern.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Nukleinsäure-Sonde verwendet, deren Hapten in die Nukleinsäure-Sonde enzymatisch mit Hilfe von DNA-Polymerasen, RNA-Polymerasen, Reversen Transkriptasen oder Terminalen Transferasen und entsprechenden Hapten-modifizierten Desoxy- oder Ribonukleosidtriphosphat-Substraten eingebaut wurde.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Nukleinsäure-Sonde verwendet, deren Hapten in die Nukleinsäure-Sonde photochemisch mit Hilfe von Photo-Hapten eingebaut wurde und in einer dritten bevorzugten Ausführungsform wird eine Nukleinsäure-Sonde verwendet, deren Hapten in die

55 Nukleinsäure-Sonde chemisch im Rahmen der Oligo-Desoxyribonukleotid-Synthese durch Einbau geschützter, mit substituierbaren Aminofunktionen modifizierter Nukleosidphosphoramidite und - nach Entfernung der Schutzgruppen - durch Umsetzung des modifizierten Oligo-Desoxyribonukleotids mit aktivierten Estern der Haptene eingebaut wurde.

Die über eine der beschriebenen Methoden hergestellte, mit einem Steroid derivatisierte Nukleinsäure-Sonde wird mit einer an einen Träger gebundenen denaturierten DNA oder RNA in Kontakt gebracht und hierbei die Temperatur, Ionenstärken, pH-Wert und sonstige Pufferbedingungen - abhängig von der Länge der Nukleinsäureprobe und der daraus resultierenden Schmelztemperatur des zu erwartenden Hybrids - so gewählt, daß die markierte DNA oder RNA an homologe DNA oder RNA binden kann (Hybridisierung) (J. Mol. Biol. 98 (1975) 503; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 3683). Als Träger geeignet sind Membranen oder Trägermaterialien auf Basis Nitrocellulose (z.B. Schleicher und Schüll BA85; Amersham Hybond C), verstärkte oder gebundene pulverförmige Nitrocellulose oder mit verschiedenen funktionellen Gruppen (z.B. Nitro-) derivatisierte Nylonmembranen (z.B. Schleicher und Schüll Nytran, NEN Gene Screen, Amersham Hybond N, Pall Biotyne).

Die Detektion von hybridisierter DNA oder RNA erfolgt dann dadurch, daß der Träger nach gründlichem Waschen und Absättigung zur Verhinderung unspezifischer Bindungen mit einem Antikörper oder Antikörperfragment inkubiert wird. Der Antikörper oder das Antikörperfragment ist gegen das in die Nukleinsäure-Sonde bei der Derivatisierung inkorporierte Steroidhapten gerichtet. Er trägt konjugiert eine Markierung. Nach der Antikörper-Inkubation wird nochmals gewaschen, um nur spezifisch gebundene Antikörper-Konjugate nachzuweisen. Die Bestimmung erfolgt sodann über die Markierung des Antikörpers oder Antikörperfragments nach an sich bekannten Methoden.

Die Länge der Brücke, über die das Hapten an die Nukleinsäure-Probe gebunden ist, kann zwischen 4 und 32 Atome betragen. Die Brücke ist hierbei aus Molekülen aufgebaut, die die Atome C, O, S oder/und N enthalten. Eine größere Kettenlänge ist zwar möglich, aber nicht mehr sinnvoll, da mit einem Sensitivitätsverlust zu rechnen ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Hapten über eine Brücke von 11 bis 16 Atomen Länge an die Probe gebunden. Bevorzugt enthält die Brücke neben hydrophoben auch hydrophile Gruppierungen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Brücke linear. In einer weiteren Ausführungsform besteht die Brücke aus einer verzweigten Kette und trägt an mindestens einem der Kettenenden ein Haptenmolekül. Durch das Vorhandensein mehrerer Haptenmoleküle an den Kettenenden einer verzweigten Kette kann die Nachweissensitivität zusätzlich verstärkt werden.

Die Verbindung des Steroid-Haptens mit der Brücke ist vorzugsweise eine Ester-, Amid- oder Etherbindung.

Die Bindung des Steroid-Haptens über die Brücke an die Nukleinsäureprobe ist sowohl über eine endständige oder nicht endständige Phosphatgruppe, als auch über einen Zuckerrest oder eine Base der Nukleinsäure-Probe möglich. Die Bindung des Haptens über die Brücke muß jedoch so erfolgen, daß nicht die Wasserstoffbrückenbildung zwischen den beiden komplementären Nukleinsäuresträngen beeinträchtigt wird.

Bevorzugt ist das Hapten über die Brücke an eine Base oder den Ribose-Anteil der Nukleinsäure-Probe gebunden, wobei das Hapten besonders bevorzugt über die Brücke an die C₅-Position von Uracil oder Cytosin, die C₆-Position von Adenin oder Guanin oder an die 2'-Position der Ribose gebunden ist.

Die Markierung des Anti-Hapten-Antikörpers oder des Antikörperfragments erfolgt in an sich bekannter Weise. Geeignet sind z. B. Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, (Bio-)Lumineszenzmarkierung oder Fluoreszenzmarkierung. Bevorzugt wird jedoch eine Enzymmarkierung mit Enzymen wie Alkalische Phosphatase, Peroxidase oder β -Galactosidase verwendet. Besonders bevorzugt wird als Markierungsenzym Alkalische Phosphatase verwendet. Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase erfolgt über Leukosysteme, insbesondere über Indigoide Systeme als oxydierbare Verbindungen (siehe EP 228 663). Als Oxydationsmittel dienen Tetrazoliumsalze. Bei dem Markierungsenzym Alkalische Phosphatase wird als Redoxsystem bevorzugt X-Phosphat/Nitroblau-Tetrazolium eingesetzt (F.P. Altmann, Tetrazolium Salts and Formazans, Progr. Histochem. Cytochem. Vol. 913 (1976), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 1). X-Phosphat ist hierbei ein Trivialname für 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat, und Nitroblau-Tetrazolium steht für die Verbindung 3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-Biphenyl)-bis-5-Phenyl-2-(4-Nitrophenyl)-Tetrazoliumchlorid (F.P. Altmann, Tetrazolium Salts and Formazans, Progr. Histochem. Cytochem. Vol. 913 (1976), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 1). Alkalische Phosphatase spaltet das chromogene Substrat, in diesem Fall X-Phosphat, das durch die Abspaltung des Phosphats und Oxidation ein blaues, schwerlösliches Dimer bildet, wobei gleichzeitig die Tetrazolium-Verbindung zu einem ebenfalls blauen, schwerlöslichen Formazan reduziert wird. Diese Redoxreaktion ist in Fig. 3 dargestellt.

Der Nachweis der anderen geeigneten Markierungssysteme ((Bio-)Lumineszenzmarkierung, Fluoreszenzmarkierung, radioaktive Markierung) wird nach an sich bekannten Methoden durchgeführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur weiteren Veranschaulichung in Fig. 4 schematisch unter Verwendung von über eine Brücke von 11 Atomen an dUTP-gebundenem Digoxigenin als Hapten darge-

stellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann besonders vorteilhaft angewendet werden zur:
in situ-Hybridisierung mit fixierten ganzen Zellen, mit fixierten Gewebsabstrichen und isolierten Chromosomen (Metaphasen-Chromosomen)

- 5 Colony-Hybridisierung (Zellen) und plaque-Hybridisierung (Phagen und Viren)
Northern-Hybridisierung (RNA-Nachweis)
Serum-Analytik (Nachweis von Virus- und bakteriellen Infektionen in Serum, Zelltyp-Analyse von Zellen im Serum; z.B. durch slot-blot-Analyse).

- 10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Bestimmungsverfahrens eine Amplifikation der sample, wie in EP-A 0200362 beschrieben, durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren definierter Sequenz (sample), welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die sample, nach Denaturierung, mit mindestens zwei Oligonucleotiden (primer), von welchen ein erstes in seiner Sequenz komplementär zu einer Teilsequenz eines Stranges der nachzuweisenden Nucleinsäure und ein weiteres identisch mit einer
15 anderen Teilsequenz desselben Stranges der nachzuweisenden Nucleinsäure ist, behandelt (Hybridisierung), mit Polymerase, vorzugsweise tag-DNA-Polymerase, mit Desoxyribonucleotiden und mit mindestens einem Desoxyribonucleotid, das chemisch gebunden ein Steroid enthält, welches an eine Position des Desoxyribonucleotids, die nicht an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist, über eine Brücke von mindestens 4 Atomen Länge gebunden ist, behandelt (Polymerisierung) und anschließend den
20 Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisierung mindestens einmal wiederholt, wobei eine zur sample komplementäre Nucleinsäure entsteht, welche markiert ist und die so entstandene markierte Nucleinsäure über einen seinerseits markierten Anti-Hapten-Antikörper nachweist. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Desoxyribonucleotide, die markierten Desoxyribonucleotide und die primer bereits vor der Denaturierungsreaktion zugesetzt.

- 25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird nach Ablauf der Zyklen eine zur sample komplementäre, an eine Festphase immobilisierte Nucleinsäure zugegeben, eine Hybridisierungsreaktion durchgeführt und nach Trennung von fester und flüssiger Phase die Markierung in der Festphase bestimmt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nucleinsäuren definierter Sequenz (sample), welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die sample nach Denaturierung mit
30 mindestens zwei Oligonucleotiden (primer), von welchen ein erstes in seiner Sequenz komplementär zu einer Teilsequenz eines Stranges der sample und ein weiteres identisch mit einer anderen Teilsequenz desselben Stranges der nachzuweisenden Nucleinsäure ist, behandelt (Hybridisierung), mit Desoxyribonucleotiden, mit Polymerase, vorzugsweise tag-DNA-Polymerase, behandelt (Polymerisierung), anschließend den Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisierung mindestens einmal wiederholt und abschließend einen Zyklus in Gegenwart von mindestens einem Desoxyribonucleotid, welches
35 chemisch gebunden ein Steroid enthält, welches an eine Position des Desoxyribonucleotids, die nicht an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist, über eine Brücke von mindestens 4 Atomen Länge gebunden ist, wobei eine zur sample komplementäre Nucleinsäure entsteht, die markiert ist und die so entstandene markierte Nucleinsäure über einen seinerseits markierten Anti-Hapten-Antikörper nachweist.

- 40 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird nach Ablauf der Zyklen eine zur sample komplementäre, an eine Festphase immobilisierte Nucleinsäure zugegeben, eine Hybridisierungsreaktion durchgeführt und nach Trennung von fester und flüssiger Phase die Markierung in der Festphase bestimmt.

Die weiteren Bedingungen für diese Verfahren sind beispielsweise in der EP-A 0200362 beschrieben und unter dem Namen Polymerase chain reaction (PCR) bekannt.

- 45 Die folgenden Beispiele erläutern in Verbindung mit den Abbildungen die Erfindung näher.

Fig. 1 zeigt ein über eine Brücke von 11 Atomen Länge mit einem Digoxigenin-Molekül markiertes Desoxyuridintriphosphat;

Fig. 2 zeigt Photodigoxigenin;

- Fig. 3 zeigt die Farbreaktionen beim Nachweis des Enzyms Alkalische Phosphatase über das
50 Redoxsystem X-Phosphat/Nitroblau Tetrazolium;

Fig. 4 zeigt schematisch eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen DNA-Nachweises;

Fig. 5 deutet die Herstellung eines RNA-Transkripts nach der SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase katalysierten Transkriptionsmethode mit den Plasmiden pSPT18 an;

- 55 Fig. 6 zeigt die unterschiedlichen DNA-Bereiche der Plasmide pSPT18;

Fig. 7 zeigt ein Syntheschema für die Herstellung von Photodigoxigenin;

Fig. 8 zeigt einen Vergleich der Sensitivitäten des erfindungsgemäßen Nachweises mit Digoxigenin als Hapten gegenüber dem Nachweis über Biotin/Streptavidin im Nachweis von Plazenta-DNA nach Southern-Blotting und Hybridisierung;

Fig. 9 zeigt einen Vergleich der Sensitivitäten einer erfindungsgemäßen enzymatischen Markierung
 5 (A) mit einer bekannten chemischen Markierung (B) im DNA-Nachweis; und
 Fig. 10 zeigt die DNA-Sequenz (A) und Restriktionskante (B) von pSPT18.

10 Beispiel 1

Digoxigenin-O-succinyl-[5-(amidoallyl)-2'-desoxy-uridin-5'-Triphosphat]-Tetralithiumsalz

15 (Dig-4-dUTP)

$C_{39}H_{52}O_{21}N_3P_3Li_4$ MG 1019,5

20 200 mg Digoxigenin-O-succinyl-N-hydroxysuccinimidester (0,34 mMol) werden in 7 ml Dimethylformamid gelöst und einer Lösung von 188 mg 5-Allylamino-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat-Tetralithiumsalz (0,34 mMol) in 6 ml H₂O zugefügt. Man gibt zu dem Reaktionsgemisch 62 ml 0,1 M Na-boratpuffer, pH 8,5 und rührt ca. 15 Stunden bei Raumtemperatur über Nacht.

25 Nach dieser Zeit beobachtet man paplerelektrophoretisch (0,05 M-Citratpuffer, pH 5,0) unter UV-Licht neben unumgesetztem 5-Allylamino-dUTP einen etwas tiefer laufenden Fleck des gewünschten Produktes.

Die Aufreinigung geschieht wie unter Beispiel 9 beschrieben.

Ausbeute: 130 mg = 37% der Th.

30 UV-Spektrum (Phosphatpuffer pH 7,0): Maxima: 220 nm, 290 nm

35 Beispiel 2

Digoxigenin-O-succinyl-ε-amidocaprinsäure

$C_{33}H_{49}O_9N$ MG: 603,8

40 In einem 250 ml-Rundkolben werden 5 g Digoxigenin-O-succinyl-N-hydroxysuccinimidester (8,5 mMol) in 150 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und dazu eine Suspension von 1,12 g 6-Aminocaprinsäure (8,5 mMol) und 1,2 ml Triethylamin in 20 ml DMF gegeben. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur magnetisch, wobei allmählich eine homogene Lösung entsteht. Nach dieser Zeit ist die Umsetzung laut

45 Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; Essigsäureethylester/Petrolether/Ethanol 1:1:1,

Detektion: Besprühen mit einer Mischung von 10 ml Eisessig + 0,2 ml konz. H₂SO₄ + 0,1 ml Anisaldehyd und Erhitzen auf 120 °C bis zum Erscheinen blauschwarzer Flecke; R_f ca. 0,7; R_f Digoxigenin-OSu-ester ca. 0,85) praktisch vollständig.

Man destilliert DMF im Hochvakuum restlos ab und löst das verbleibende Öl in 50 ml H₂O unter
 50 Zugabe von konz. Ammoniaklösung. Dann wird durch Zufügen von 225 ml wäßriger Zitronensäurelösung (100 g Zitronensäure/l) die "freie" Digoxigeninamidocaprinsäure abgeschieden. Die harzig-zähe Masse wird durch Anreiben mit Wasser fest; man saugt ab, wäscht mehrfach mit H₂O nach und trocknet letztlich über P₂O₅ im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 3,45 g = 68% der Th.

55

Beispiel 3

Digoxigenin-O-succinyl- ϵ -amidocapronsäure-N-hydroxysuccinimidesterC₃₇H₅₂O₁₁N₂ MG: 700,8

In einem 100 ml-Rundkolben werden 3,45 g Digoxigenin-O-succinyl- ϵ -amidocapronsäure (5,7 mMol) in 20 ml wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) gelöst, und nacheinander mit 0,7 g N-Hydroxysuccinimid (8 mMol), sowie 1,3 g Dicyclohexylcarbodiimid (8,3 mMol) versetzt. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur, saugt anderntags vom abgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff ab und zieht das DMF im Ölpumpenvakuum ab. Das zurückbleibende Öl wird in 20 ml Essigsäureethylester aufgenommen und in ca. 150 ml eiskalten (-20 °C) Petrolether eingerührt. Das ausgefallene, anfangs noch harzig-zähe Produkt reibt man mehrfach mit eiskaltem trockenem Petrolether bis zum Festwerden durch. Nach Trocknung über P₂O₅ im Vakuum erhält man 3,35 g = 84 % der Th.

Elementaranalyse:

C ber.: 63,4%	H ber.: 7,5%	N ber.: 4,0 %
C gef.: 63,1%	H gef.: 7,7%	N gef.: 4,07%.

Beispiel 4

Digoxigenin-O-succinyl- ϵ -amidocaproyl-[5-(amidoallyl)-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat]-Tetranatriumsalz

(Dig-11-dUTP)

C₄₅H₅₃O₂₂N₄P₃Na₄ MG: 1196,7

260 mg Digoxigenin-O-succinyl- ϵ -amidocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester (0,37 mMol) werden in 7 ml DMF gelöst und zu einer Lösung von 200 mg 5-Allylamino-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat-Tetralithiumsalz (0,37 mMol) in 8 ml H₂O gegeben. Man fügt dem Gemisch 62 ml 0,1 m-Natriumboratpuffer, pH 8,5 zu und rührt bei Raumtemperatur über Nacht (ca. 15 Stunden).

In der Papierelektrophorese (0,05 m-Citratpuffer, pH 5,0) beobachtet man im UV-Licht nach dieser Zeit neben etwas unumgesetztem Allylamino-dUTP einen etwas tiefer laufenden Fleck der gewünschten Verbindung (alternativ: Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgel, Fließmittel Isobuttersäure/konz. Ammoniaklösung/H₂O = 66:1:33, Detektion im UV oder Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz - siehe Beispiel 2 -; R_F-Werte: 5-Allylamino-dUTP 0,2; Dig-amidocapronsäure-OSu-ester 0,7; Dig-11-dUTP 0,45).

Zur Aufreinigung wird das Reaktionsgemisch im Ölpumpenvakuum bis zum festen Rückstand eingedampft, in 200 ml H₂O aufgenommen und auf eine Ionenaustauschersäule (DEAE-Sephadex A25, HCO₃⁻-Form, Säulendimension 1,5 x 30 cm) gegeben. Nach Aufziehen wird kurz mit Wasser gewaschen, dann mit einem Gradient von je 1 l H₂O auf 0,4 m TEAB (Triethylammoniumbicarbonat), pH 8 eluiert. Die reines Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, im Vakuum konzentriert und durch mehrfaches Eindampfen mit Methanol von überschüssigem TEAB befreit (kein Geruch von freiem Triethylamin mehr!). Man nimmt den Kolbeninhalt in wenigen ml Wasser auf, passiert die Lösung über eine kurze Kationenaustauschersäule DOWEX 50 WS8 (1 x 10 cm) in der Na⁺-Form, wäscht die Säule bis zur ODE-Freiheit des Waschwassers (Messung im UV bei 240 nm) und dampft im Vakuum bis auf ca. 20 ml ein. Nach Lyophilisation werden 200 mg (45% der Th.) Dig-11-dUTP-Na₄ als weißes Pulver erhalten.

Analytik: H₂O-Bestimmung: 7,9%Elementaranalyse: (unter Berücksichtigung des H₂O-Gehaltes):

C ber.: 41,8%	H ber.: 5,3%	N ber.: 4,3%	P ber.: 7,2%
C gef.: 41,08%	H gef.: 5,35%	N gef.: 4,7%	P gef.: 7,1%.

5 UV-Spektrum (Phosphatpuffer pH 7,0): Maxima: 220 nm, 290 nm.

Beispiel 5

10

Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobuttersäure

$C_{21}H_{45}O_9N$ MG: 575,8

15

Die Verbindung wird durch Umsetzung von 3 g Digoxigenin-O-succinyl-N-hydroxysuccinimidester (5,1 mMol) mit 0,63 g 4-Aminobuttersäure (6,1 mMol) wie in Beispiel 1 für das Capronsäurederivat beschrieben, hergestellt. Nach erfolgter Umsetzung wird das Reaktionsgemisch im Vakuum eingedampft, der Rückstand in H_2O -Methanol (20%) gelöst und über eine Kationenaustauschersäule (DOWEX 50 WX8) in der H^+ -Form gegeben. Eluat und Waschwasser (pH ca. 4) werden eingedampft, der zurückbleibende schmierig-zähe Rückstand in n-Butanol gelöst und dreimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die Butanol-Phase enthält das gewünschte Produkt und wird nach Abziehen des Butanols und dreimaliger Codestillation mit wasserfreiem DMF (Entfernung restlichen Wassers) direkt zur Weiterverarbeitung zum entsprechenden N-Hydroxysuccinimidester (Beispiel 6) eingesetzt.

20

25 Ausbeute: 2,94 g (Öl)

Beispiel 6

30

Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobuttersäure-N-hydroxysuccinimidester

$C_{25}H_{48}O_{11}N_2$ MG: 672,8

35

2,94 g Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobuttersäure (ca. 5,1 mMol) werden als Öl aus Beispiel 5 mit 0,62 g N-Hydroxysuccinimid (5,4 mMol) und 1,16 g Dicyclohexylcarbodiimid (5,6 mMol) in 20 ml wasserfreiem DMF wie unter Beispiel 3 beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Der resultierende Hydroxysuccinimidester wird als Öl - wie in Beispiel 7 beschrieben - mit ϵ -Aminocapronsäure umgesetzt.

40

Ausbeute: 3,46 g (Öl)

Beispiel 7

45

Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobutyryl- ϵ -amidocapronsäure

$C_{37}H_{56}O_{10}N_2$ MG: 689,0

50

In einem 250 ml-Rundkolben werden 0,8 g ϵ -Aminocapronsäure (6,2 mMol) und 0,75 ml Triethylamin in 12 ml DMF suspendiert und dazu eine Lösung von 3,46 g Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobuttersäure-N-hydroxysuccinimidester (5,1 mMol, Öl aus Beispiel 6) in 90 ml DMF gegeben. Man läßt über Nacht ca. 15 Stunden bei Raumtemperatur rühren, wonach eine nahezu homogene Lösung entstanden ist. Laut DC

55

(Bedingungen siehe unter Beispiel 2) ist die Umsetzung fast quantitativ.

Die Aufarbeitung geschieht wie unter Beispiel 5 beschrieben (Überführung in die "freie" Carbonsäure durch DOWEX 50-Chromatographie, Extraktion mit n-Butanol). Die Butanol-Phase enthält neben dem gesuchten Produkt noch etwas polareres und unpolareres Material und wird deswegen durch Chromatogra-

phie an Kieselgel 60 (Säule 40x3cm, Elutionsmittel Essigsäureethylester/Petrolether 50/75/Ethanol 1:1:1) gereinigt. Nach Vereinigen der sauren Fraktionen und Eindampfen erhält man als Öl 1,48 g = 42% der Th.

5

Beispiel 8

Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobutyryl- ϵ -amidocaprinsäure-N-hydroxysuccinimid-ester

10

$C_{44}H_{53}O_{12}N_3$ MG: 785,8

0,2 g Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobutyryl- ϵ -amidocaprinsäure (Öl aus Beispiel 7, ca. 0,29 mMol) werden mit 0,034 g N-hydroxysuccinimid (0,3 mMol) und 68 mg Dicyclohexylcarbodiimid (0,32 mMol) in 8 ml wasserfreiem DMF wie unter Beispiel 3 beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Der erhaltene ölige Rückstand ist auch durch mehrfaches Durchreiben mit kaltem Petrolether nicht festzubekommen und wurde daher nach Abziehen der Lösungsmittel direkt - wie in Beispiel 9 beschrieben - mit 5-Aminoallyl-dUTP zur Reaktion gebracht.

20 Ausbeute: 0,25 g (Öl)

Beispiel 9

25

Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobutyryl- ϵ -amidocaproyl-(5-amidoallyl)-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat-Tetralithiumsalz

30 (Dig-16-dUTP)

$C_{49}H_{70}O_{23}N_5P_3Li_4$ MG 1217,7

35 250 mg Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobutyryl- ϵ -amidocaprinsäure-N-hydroxy-succinimid-ester (Öl aus Beispiel 8, ca. 0,3 mMol) werden in 7 ml DMF gelöst und zu einer Lösung von 210 mg 5-Allylamino-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat-Tetralithiumsalz (0,38 mMol) in 6 ml H₂O gegeben. Man gibt dem Reaktionsgemisch 62 ml 0,2 m Natriumboratpuffer, pH 8,5 zu und rührt ca. 15 Stunden über Nacht bei Raumtemperatur. Der Reaktionsablauf wird wie unter Beispiel 4 beschrieben, verfolgt.

40 Zur Aufreinigung wird der Ansatz im Ölpumpenvakuum bis zum festen Rückstand eingedampft, in ca. 200 ml H₂O gelöst und auf eine Ionenaustauschersäule (DEAE-Sephadex A-25, Cl⁻-Form, Säulenabmessung 1,5 x 30 cm) gegeben. Nach Waschen mit H₂O wird mit einem linearen Gradienten von 2 l H₂O auf 2 l 0,3 m-LiCl eluiert. Die das reine Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, im Vakuum so weit konzentriert, bis kein H₂O mehr übergeht und das Konzentrat anschließend in einem Aceton-Ethanol-Gemisch (3:1) durch Einrühren gefällt. Man zentrifugiert vom Überstand ab, wäscht bis zur Cl⁻-Freiheit mit Ethanol und trocknet mit Vakuum über P₂O₅/KOH.

45 Ausbeute: 250 mg = 68 % der Th.

Analytik: H₂O-Bestimmung: 6,3%.

Elementaranalyse (unter Berücksichtigung des H₂O-Gehaltes):

50

C ber.: 45,5%	H ber.: 5,7%	N ber.: 5,4%	P ber.: 7,2%
C gef.: 45,1%	H gef.: 5,6%	N gef.: 5,6%	P gef.: 7,0%

55 UV-Spektrum (Phosphatpuffer pH 7,0):

Maxima: 220 nm (Schulter)

289 nm

Beispiel 10

Digoxigenin-O-succinyl- ϵ -amidocaproyl-[5-(amidoallyl)-uridin-5'-triphosphate]-Tetralithiumsalz

(Dig-11-UTP)

$C_{43}H_{63}O_{23}N_4P_3Li_4$ MG: 1148,5

Die Verbindung wird durch Umsetzung von 520 mg Digoxigenin-O-succinyl- ϵ -amidocaprönsäure-N-hydroxysuccinimidester (0,74 mMol) mit 416,5 mg 5-Allylamino-UTP-Tetralithiumsalz (0,74 mMol) analog Beispiel 4 hergestellt. Die Ionenaustauscherchromatographie erfolgt jedoch in Abwandlung nach Beispiel 9 an DEAE-Sephadex-A-25 in der Cl^- -Form.

Ausbeute: 560 mg = 66 % d. Th.

Analytik: H_2O -Bestimmung: 8,1%

Elementaranalyse (unter Berücksichtigung des H_2O -Gehaltes):

C ber.: 43,5%	H ber.: 5,47%	N ber.: 4,5%	P ber.: 7,47%
C gef.: 43,1%	H gef.: 5,3%	N gef.: 4,5%	P gef.: 7,35%

UV-Spektrum (Phosphatpuffer pH 7,0):

entspricht Dig-11-dUTP

Beispiel 11

Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobutyryl- ϵ -amidocaproyl-[5-(amidoallyl)-uridin-5'-triphosphat]-Tetralithiumsalz

(Dig-16-dUTP)

$C_{43}H_{70}O_{24}N_5P_3Li_4$ MG: 1233,7

Die Verbindung wird durch Umsetzung von 250 mg Digoxigenin-O-succinyl- γ -amidobutyryl- ϵ -amidocaprönsäure-N-hydroxysuccinimidester (0,3 mMol, nach Beispiel 8 erhalten) mit 214 mg 5-Allylamino-UTP- Li_4 (0,38 mMol) analog Beispiel 9 hergestellt.

Ausbeute: 218 mg = 59 % d. Th.

Analytik: H_2O -Bestimmung = 7,2%

Elementaranalyse (unter Berücksichtigung des H_2O -Wertes):

C ber.: 44,45%	H ber.: 5,67%	N ber.: 5,3%	P ber.: 7,0%
C gef.: 44,3 %	H gef.: 5,5 %	N ber.: 5,3%	P gef.: 7,1%

UV-Spektrum (Phosphatpuffer pH 7,0):

entspricht Dig-16-dUTP

Beispiel 12

Herstellung von N-Azidobenzoyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan

5,20 g (20 mmol) Azidobenzoessäure-N-hydroxysuccinimidester (Fa. Pierce, D-6054 Rodgau 1) werden in wasserfreiem Essigester gelöst und mit 29,3 ml (200 mmol) 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan versetzt. Die Reaktionsmischung läßt man 20 Stunden bei 20° C im Dunkeln rühren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand in 300 ml Wasser gelöst. Das Produkt wird mit 2 l Toluol in einem Perforator aus der wäßrigen Phase extrahiert, wobei man die Apparatur mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Extraktion ist nach ca. 16 Stunden beendet. Die organische Phase wird am Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das Produkt durch präparative Säulenchromatographie an Kieselgel (Säule 80 x 10 cm, Eluent: Chloroform/Methanol/konz. Ammoniaklösung 65:30:5) aufgereinigt und nach Abdampfen des Lösungsmittels im Hochvakuum getrocknet.

10 Ausbeute: 3,2 g (55%); farbloses, zähes Öl.

Beispiel 13

15 Herstellung von Digoxigenin-3-hemisuccinat[N'-(4-azidobenzoyl)]-8-amino-3,6-dioxaoctylamid (Photodigoxigenin)

2,93 g (10 mmol) des Produktes aus Beispiel 12 werden in 200 ml wasserfreiem Dioxan gelöst und mit 5,87 g (10 mmol) Digoxigenin-3-hemisuccinat-N-hydroxysuccinimidester (Herstellung analog: G. C. Oliver, Jr. Brent, M. Parker, D.L. Brasfield und Ch.W. Parker; J. clin. Invest. 47 (1986), 1035) versetzt. Man läßt 20 Stunden bei Raumtemperatur rühren, entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und trennt das entstandene Produkt durch präparative Mitteldruck-Flüssig-Chromatographie ab (Säulenvolumen: 1640 ml, Labochrom Reversed-Phase-Silica HD-SIL-18-30-60, Eluent Methanol/Wasser 7:3 + 1 % Eisessig). Nach Sammlung der entsprechenden Fraktionen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand in Dioxan gelöst. Nach Lyophilisation und Waschen mit 100 ml Diisopropylether wird das Produkt Digoxigenin-3-hemisuccinat[N'-(4-azidobenzoyl)]-8-amino-3,6-dioxaoctylamid als farbloser, leicht klebriger Feststoff erhalten, der im Hochvakuum getrocknet wird.

25 Ausbeute: 4,9 g (64%).

30 IR (Aceton): = 2150, 1728, 1639 cm⁻¹.

Beispiel 14

35 Markierung einer Nukleinsäure-Sonde nach der "Random Primed" Methode

1 µg der zu markierenden linearen DNA wurde in einem Volumen von 10 µl durch 5minütiges Kochen und anschließendes Abschrecken auf Eis denaturiert. Danach wurden in einem Reaktionsgefäß je 1 µl einer 2 mmol/l Lösung von Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytidintriphosphat und Desoxyguanosintriphosphat und die denaturierte DNA vereinigt. Dazu wurde 1 µl einer Lösung, die 1,4 mmol/l Desoxythymidintriphosphat und 0,6 mmol/l, wie in Beispiel 4 hergestelltes Digoxigenin-11-dUTP enthält zugesetzt. Danach wurden 2 µl eines sogenannten Reaktionsgemisches zugegeben. Das Reaktionsgemisch enthielt als wichtigste Komponente das sogenannte "Random-Hexanucleotid". Es handelt sich dabei um chemisch synthetisierte Oligonukleotide von 6 Basen Länge, wobei bei der Synthese in jedem Schritt alle 4 Nukleotide (A, C, G und T) angeboten werden und somit ein Gemisch aller möglichen Oligonukleotid-Sequenzen entsteht. Die chemische Zusammensetzung des Reaktionsgemisches war: Tris-HCl, 0,5 mol/l; MgCl₂, 0,1 mol/l; Dithioeritrit, 1 mmol/l; Rinderserum-Albumin, molekularbiologische Qualität, 2 mg/ml; Random Hexanucleotid, 3,125 mg/ml; pH 7,2 (20° C); zuletzt wurde 1 µl Klenow Polymerase, entsprechend 2 Einheiten, zugegeben und die Mischung mit sterilem Wasser auf 20 µl Endvolumen gebracht und 1 Stunde bei 37° C inkubiert.

40 Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 mol/l EDTA (Ethylendinitrilo-Tetraessigsäure), pH 8,0 gestoppt und uneingebaute Desoxyribonukleosidtriphosphate wurden durch eine Ethanol-fällung abgetrennt. Hierzu wurden dem Inkubationsansatz 2 µl LiCl, 4 mol/l, und 60 µl auf -20° C vorgekühltes absolutes Ethanol zugegeben, gemischt und der Fällungsansatz bei -70° C 30 Minuten lang oder bei -20° C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde bei 12000 x g (Erdbeschleunigung) 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, der Niederschlag kurz mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und zuletzt im Vakuum getrocknet. Die markierte gereinigte DNA wurde schließlich in 50 µl TE-Puffer (Tris-HCl, 10 mmol/l;

EDTA, 1 mmol/l; pH 8,0) resuspendiert.

Beispiel 15

Markierung einer Nukleinsäure-Sonde nach der "Nick Translations" Methode

1 µg der zu markierenden DNA wurde gemischt mit je 1 µl einer 0,4 mmol/l Lösung von Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytidintriphosphat und Desoxyguanosintriphosphat.

Es wurde dann 1 µl einer Lösung, die 0,35 mmol/l Desoxythymidintriphosphat und 0,15 mmol/l wie in Beispiel 4 hergestelltes Dig-11-dUTP enthielt, zugesetzt. Desweiteren wurden 2 µl einer 10-fach-konzentrierten Puffer-Lösung (Tris-HCl, 0,5 mol/l; MgCl₂, 0,1 mol/l; Dithioerythrit, 1 mmol/l; pH 7,5) sowie 2 µl einer Enzym-Lösung, enthaltend 2 Einheiten DNA Polymerase I und 1,6 mEinheiten DNaseI zugesetzt, mit sterilem zweifach destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und der Ansatz 60 Minuten bei 14 °C inkubiert.

Die Reaktion wurde wie im Beispiel 13 mit EDTA gestoppt und die markierte DNA wie oben beschrieben gereinigt und gelöst.

Beispiel 16

Markierung einer Nukleinsäure-Sonde mit der "Tailing" Methode

Bei der 3'-Endmarkierung mit Hilfe des Enzyms Terminal Transferase wurde ein Digoxigenin-11-Desoxyuridintriphosphat eingesetzt. Dieses wurde, wie im Beispiel 4 beschrieben, synthetisiert, mit der Ausnahme, daß als Ausgangssubstanz 5-Allylamino-2',3'-dideoxy-uridin-5'-triphosphat-Tetralithiumsalz anstelle des 2'-Desoxyuridinsalzes eingesetzt wurde. Die Markierungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

In einem Reaktionsgefäß wurden gemischt:

25 µl Markierungspuffer (Kallum-Kakodylat, 200 mmol/l; Tris-HCl, 50 mmol/l; Rinderserumalbumin, 0,4 mg/ml; pH 7,2), 5 µl 25 mmol/l CoCl₂-Lösung, 1,5 µg Haell-gespaltene pBR322-DNA und 5 µl entsprechend 25 Einheiten Terminal Transferase. Das Volumen wurde mit sterilem zweifach destilliertem Wasser auf 48 µl gebracht und schließlich 2 µl einer 0,1 mmol/l Lösung von Digoxigenin-11-ddUTP zugegeben.

Nach Mischen und Zentrifugation wurde die Reaktion bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

Das Abstoppen der Reaktion und die Abtrennung uneingebauter Nukleotide erfolgte wie oben im Beispiel 14 beschrieben.

Beispiel 17

Markierung einer Nukleinsäure-Sonde mit der "Transkriptions" Methode

Das Prinzip der Reaktion ist der Fig. 5 zu entnehmen. Die zur Markierung verwendete DNA wurde in den Transkriptionsvektor pSPT18 (Fig. 6 und Fig. 10) insertiert. Der Vektor enthält einen Promotor für die SP6 und einen Promotor für die T7 RNA Polymerase. Die DNA wurde vor der Markierungsreaktion an einer Stelle außerhalb der insertierten DNA-Sequenz und der Promotoren, sowie den die Promotoren die DNA-Sequenz verbindenden Sequenzen linearisiert.

1 µg der linearisierten Substrat-DNA wurde in einem Reaktionsgefäß je 1 µl einer 10 mmol/l Lösung von Adenosintriphosphat, Cytidintriphosphat und Guanosintriphosphat zugesetzt. Dazu wurde 1 µl einer Lösung, die 6,5 mmol/l Uridintriphosphat und 3,5 mmol/l Digoxigenin-11-UTP enthält, zugegeben. Digoxigenin-11-UTP wird im Beispiel 10, ähnlich wie im Beispiel 4 Digoxigenin-11-dUTP hergestellt, als Ausgangssubstanz wird lediglich anstelle des Allylamino-Desoxyuridinsalzes das Allylamino-Uridinsalz eingesetzt.

Weiterhin wurden dem Ansatz 2 µl eines 10fach konzentrierten Puffers (Tris-HCl, 0,4 mol/l; MgCl₂, 60 mmol/l; Dithiothreitol, 50 mmol/l; Spermidin, 40 mmol/l; pH 7,2) zugegeben, das Volumen auf 19 µl mit sterilem bidestilliertem Wasser aufgefüllt und schließlich die Reaktion durch Zugabe von 1 µl, entsprechend

10 Einheiten der RNA Polymerase (SP6 bzw. T7) gestartet.

Nach kurzer Zentrifugation wurde der Ansatz bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

Die Substrat-DNA wurde anschließend durch Zusatz von 1 µl DNaseI, RNase-frei, entsprechend 10 Einheiten, 15 Minuten bei 37 °C abgebaut.

- 5 Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 mol/l EDTA, pH 8,0 gestoppt. Die erhaltene Digoxigenin-markierte RNA-Probe wurde durch Extraktion mit 1 Volumen Phenol und durch anschließende Ethanol-Präzipitation von Proteinen und Nukleotiden gereinigt und schließlich in sterilem Puffer (Tris-HCl, 10 mmol/l; EDTA, 1 mmol/l; pH 8,0) gelöst.

10

Beispiel 18

Markierung einer Nukleinsäure-Sonde mit der "photochemischen" Methode

15

Die gereinigte DNA-Lösung (keine organischen Puffer) vorzugsweise in einer Konzentration von 0,5 bis 1,0 µg/µl wurde in einem Eppendorf Reaktionsgefäß im Halbdunkeln mit demselben Volumen einer 1 mg/ml Photodigoxigenin-Lösung (Beispiel 13) vermischt. Das Gemisch wurde unter Eiskühlung mit einer Philips HPLR 400 W Lampe in 10 cm Abstand 10 bis 30 Minuten lang von oben durch die Gefäßöffnung

20

bestrahlt. Das Reaktionsgemisch mußte dabei kalt bleiben.

Nach der Reaktion wurde mit 0,1 M Tris-HCl, pH 9,0, 1,0 mM EDTA auf 100 µl aufgefüllt.

Die Lösung wurde mit 100 µl Butan-2-ol ausgeschüttelt, kurz zentrifugiert und die obere Butanolphase entfernt.

25

Die Butan-2-ol Extraktion wurde einmal wiederholt, die wäßrige Phase sollte jetzt auf 30 bis 40 µl konzentriert sein.

Nach Zugabe von Träger (Carrier) DNA (nur bei kleinen DNA Mengen) wurde durch Zugabe von 5 µl 3 M Natriumacetat oder einem entsprechenden Salz (z.B. 4 M LiCl) und 100 µl Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt.

30

Nach Zentrifugation bei 4 °C für 15 Minuten in einer Eppendorfsentrifuge wurde das Pellet mit kaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 0,1 mM EDTA gelöst.

Beispiel 19

35

Hybridisierung mit einer markierten DNA-Sonde

Zur Hybridisierung wurde ein Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schüll, BA 85) mit darauf fixierter DNA verwendet. Zur Vorhybridisierung wurde der Filter zunächst 1 Stunde in einer Lösung, bestehend aus NaCl, 0,75 mol/l Na-Citrat, 75 mmol/l; Casein, 0,5 % (w/v); Laurylsarcosin, 0,1 % (v/v); Natriumdodecylsulfat, 0,02 % (w/v); pH 7,0 (20 °C) bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch eine frische Lösung der selben Zusammensetzung ersetzt, der zusätzlich 100 ng/ml der wie in Beispiel 14 bis 16 oder 18 hergestellten markierten, frisch denaturierten DNA zugegeben wurden. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 65 °C für 14 Stunden. Danach wurde unspezifisch gebundene DNA durch zwei Waschschr

40

48

itte entfernt und zwar zuerst mit einer Lösung von NaCl, 0,3 mol/l; Na-Citrat, 30 mmol/l; Na-Dodecylsulfat, 0,1 % (w/v); pH 7,0 für 2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend mit einer Lösung von NaCl, 15 mmol/l; Na-Citrat, 1,5 mmol/l; Na-Dodecylsulfat, 0,1 % (w/v); pH 7,0 für 2 x 15 Minuten bei 65 °C.

50

Beispiel 20

Hybridisierung mit einer markierten RNA-Sonde

55

Hybridisierung und anschließende Waschungen wurden exakt wie im Beispiel 19, anhand der DNA-Probe geschildert, durchgeführt. Es wurde lediglich anstelle der im Beispiel geschilderten denaturierten markierten DNA-Probe eine wie im obigen Beispiel 17 markierte, frisch denaturierte RNA-Probe verwendet.

Die Konzentration der Digoxigenin-markierten RNA in der Hybridisierungslösung wurde so gewählt, daß

pro ml Hybridisierungslösung die Transkripte von 100 ng Substrat-DNA eingesetzt wurden.

Beispiel 21

5

Detektion mit Hilfe des Nachweis-Systems Alkalische Phosphatase/X-Phosphat/Nitroblau-Tetrazolium

Der hybridisierte Filter aus Beispiel 19 oder 20 wurde zunächst 1 Minute in Tris-HCl, 0,1 mol/l, pH 7,5; NaCl, 0,15 mol/l gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Membran wurde anschließend mit 0,5% (w/v) Casein in Tris-HCl 0,1 mol/l, pH 7,5; NaCl, 0,15 mol/l 40 Minuten lang unter leichtem Schwenken inkubiert.

Danach wurde die Antikörperbindungsreaktion durchgeführt. Dazu wurde die Membran mit Anti-Digoxigenin/Alkalische Phosphatase-Konjugat, 150 mEinheiten/ml in Tris-HCl, 0,1 mol/l; pH 7,5; NaCl, 0,15 mol/l 20 Minuten lang inkubiert. Unspezifisch gebundenes Protein wurde dann durch 2 x 15 minütiges Waschen mit dem selben Puffer entfernt. Danach wurde der Filter in Tris-HCl, 0,1 mol/l, pH 9,5; NaCl 0,1 mol/l; MgCl₂, 50 mmol/l 5 Minuten lang auf pH 9,5 umequilibriert, die Alkalische Phosphatase hat nämlich bei höheren pH-Werten ihr Aktivitätsoptimum. Der Nachweis gebundenen Antikörper-Konjugats und damit der hybridisierten markierten DNA erfolgte durch eine von der Alkalischen Phosphatase katalysierten Farbreaktion. Dazu wurde der Filter in Tris-HCl, 0,1 mol/l, pH 9,5; NaCl, 0,1 mol/l; MgCl₂, 50 mmol/l, wobei pro 10 ml Lösung 45 µl Nitroblau-Tetrazolium-Lösung (75 mg/ml in Dimethylformamid, 70 % (v/v)) und 35 µl einer X-Phosphatlösung (50 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat in Dimethylformamid) zugesetzt wurden, inkubiert.

Die Farbreaktion erfolgte unter weitgehendem Sauerstoffausschluß, indem man die Membran mit dieser Lösung in eine Folie (normale Koch- oder Gefrierbeutel) einschweißte und im Dunkeln aufbewahrte. Die Farbreaktion setzte sehr schnell ein, konnte aber an Intensität noch über mehrere Tage zunehmen. Eine Dokumentation des Ergebnisses wurde durch Photographie bzw. Photokopieren des feuchten Filters erhalten. Sodann wurde der Filter getrocknet und so aufbewahrt. Die Färbung blieb erhalten, verblaßte jedoch etwas. Sie ließ sich durch Anfeuchten des Filters wieder intensivieren.

30

Beispiel 22

Vergleich der Sensitivitäten und des Hintergrunds im DNA-Nachweis (Southern-Blot) bei Verwendung von a) nach Beispiel 14 mit Digoxigenin enzymatisch und b) mit Biotin enzymatisch markierter DNA.

I. Humane Plazenta-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten. Unterschiedliche Mengen davon wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend nach der Methode von Southern (J. Mol. Biol. 98 (1975) 503) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die DNA auf der Membran wurde durch 2 Stunden backen bei 80 °C im Vakuumschrank fixiert. Die Membranen wurden mit einem markierten DNA-Fragment, das der cDNA des humanen Gewebs-Plasminogenaktivators entspricht (Pennica D. et al, Nature 301 (1983) 214) hybridisiert. Das humane Gewebs-Plasminogenaktivatorgen ist im menschlichen Genom einmal vorhanden. Die cDNA dieses Gens hybridisiert mit den entsprechenden Banden des Genoms. Zum einen wurde das DNA-Fragment wie in Beispiel 14 mit Digoxigenin markiert, mit 100 ng/ml markierter DNA wie in Beispiel 19 hybridisiert und wie in Beispiel 21 beschrieben die Hybride detektiert. Zum anderen wurde das Fragment im analogen Verfahren mit Biotin markiert. Dabei wurde Biotin 16-dUTP (Brigati et al., Virology 126 (1983) 32-50) eingesetzt. Die DNA auf der Membran wurde mit 50 µg/ml markierter DNA hybridisiert. Ansonsten wurde nach Beispiel 19 verfahren. Die Detektion erfolgte wie in Beispiel 21 beschrieben, mit der Ausnahme, daß ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet wurde. Im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Verfahren zum Biotinsystem zeigte das hier beschriebene System zur Biotinmarkierung ("Random primed"-Markierung, Mischung Biotin 16-dUTP/dTTP, Prähybridisierung mit der im Beispiel 19 angegebenen Lösung, Hybridisierung mit der angegebenen Konzentration an DNA, Blockierung mit der im Beispiel 21 angegebenen Lösung) geringeren Hintergrund und höhere Sensitivität. Dennoch ist bei der beschriebenen Verwendung von Digoxigenin anstelle von Biotin im optimierten System eine deutliche weitere Reduktion des Hintergrundes gegeben, wobei die Sensitivität erhalten bleibt. (Fig. 8)

Beispiel 23

Vergleich der Sensitivitäten im DNA-Nachweis (Southern-Blot) bei Verwendung von a) nach Beispiel 14 mit Digoxigenin enzymatisch und b) nach Beispiel 1 und 2 der europäischen Patentanmeldung 0173251 mit Digoxigenin chemisch markierter DNA.

pBR328 DNA wurde separat mit den Restriktionsenzymen BglI und HinfI gespalten. Die erhaltenen Fragmente wurden zu gleichen Teilen gemischt. Die Mischung enthält danach 15 pBR328-Fragmente der Größe: 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298 (2x), 234 (2x), 220 und 154 (2x) bp.

Unterschiedliche Mengen der Fragmente wurden dann in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und anschließend nach der Methode von Southern (J. Mol. Biol. 98 (1975) 503) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Fixieren der DNA-Fragmente durch Erhitzen der Membran im Vakuum auf 80 °C wurde diese mit 100 ng/ml nach Beispiel 14 mit Digoxigenin markierter DNA wie im Beispiel 19 beschrieben hybridisiert. Die Detektion der Hybride erfolgte exakt wie im Beispiel 21 beschrieben. Wie Fig. 9A in Verbindung mit Tabelle I zeigt, können Fragmente bis hinab zu einer Menge von 1 bis 0,1 pg nachgewiesen werden.

Als Vergleich wurde pBR328 DNA mit NciI gespalten. Es entstehen 10 Fragmente der Größe: 810, 724, 696, 597, 522, 507, 364, 351, 244 und 92 bp. Auch hier wurden unterschiedliche DNA-Mengen elektrophoresiert und anschließend nach Southern auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde dann wie in Beispiel 19 beschrieben, hybridisiert. Es wurden allerdings hier 200 ng/ml wie in Beispiel 1 und 2 der EPA 0173251 markierte pBR322 DNA zur Hybridisierung eingesetzt. pBR328 DNA unterscheidet sich von der als Sonde eingesetzten pBR322 DNA lediglich durch das 810 bp große NciI-Fragment, welches pBR328 enthält, pBR322 dagegen nicht. Dieses wird also in der Hybridisierung nicht detektiert werden. Nach der Hybridisierung wurden die Hybride genauso wie im Beispiel 21 beschrieben detektiert. Wie Fig. 9B in Verbindung mit Tabelle II zeigt, können nach dieser Methode lediglich DNA-Fragmente bis zu einer Menge von 25 bis 2,5 pg nachgewiesen werden. Durch die enzymatische Markierung wird also im Vergleich zur chemischen Markierung eine um das Vielfache (Faktor 25) höhere Sensitivität der DNA-Detektion erreicht.

30

35

40

45

50

55

Tabelle I: Menge der DNA in den einzelnen Fragmenten einer Mischung von pBR 328-BglII-Fragmenten und

Fragmentgröße	aufgetragene Menge (pg) DNA				Menge in pg entsprechend der einzelnen Banden
	125	25	5	1	
2167 bp ± 22,08 %	27,6*	5,5*	1,1*	0,22*	}
1766 bp ± 17,99 %	22,5*	4,5*	0,9*	0,18*	
1230 bp ± 12,53 %	15,7*	3,1*	0,6*	0,12	
1033 bp ± 10,53 %	13,2*	2,6*	0,5*	0,1	
653 bp ± 6,65 %	8,3*	1,66*	0,3	0,07	
517 bp ± 5,27 %	6,6*				
453 bp ± 4,62 %	5,78*				
394 bp ± 4,01 %	5,0				

* Banden, die auf dem Blot in Fig. 9A (feucht!) deutlich gefärbt sind.

Tabelle II

pBR328, NciI-Spaltung: Menge der DNA in den einzelnen Fragmenten in Abhängigkeit von der Gesamt-DNA Menge pro Bahn.					
Fragment-Größe (bp)	Anteil, % der Gesamt-DNA	aufgetragene Menge DNA (pg)			
		100	200	1000	2000
810	16,5	16,5	33,0	165,1	330,1
724	14,8*	14,8*	29,5*	147,5*	295,1*
696	14,2*	14,2*	28,4*	141,8*	283,7*
597	12,2*	12,2*	24,3*	121,7*	243,3*
522	10,6*	10,6*	21,3*	106,4*	212,8*
507	10,3*	10,3*	20,7*	103,3*	206,6*
364	7,4	7,4	14,8*	74,2*	148,4*
351	7,2	7,2	14,3*	71,5*	143,1*
244	5,0	5,0	9,9	49,7*	99,4*
92	1,9	1,9	3,7	18,7*	37,5*
Summe:					
4907	100				

Die auf der feuchten Membran des Blots von Fig. 9B noch gut sichtbaren Fragmente sind mit * markiert.

Beispiel 24

Nachweis von HPV-Sequenzen in fixierten HeLa- und SiHa-Zelllinien durch in situ-Hybridisierung.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die in situ-Hybridisierung mit Träger-fixierten Zellen und Zellabstrichen durchgeführt werden.

Für den nichtradioaktiven HPV-Nachweis wurden zwei Zelllinien verwendet:

SiHa-Zellen (2 - 3 Kopien HPV/Zelle) ATCC-Nr. HTB 35 (Biology 159 (1987) 389 - 398)

HeLa-Zellen (100 - 200 Kopien HPV/Zelle) ATCC-Nr. CCL 2 (Human Genetics 77 (1987) 251 - 255)

DNA-Probe:

HPV-DNA (Sequenz vgl. Progress med. Virol. 32 (1985) 15 ff.)

Markierungen:

Biotin-11-dUTP (Blugene nonradioaktive DNA detection kit, Best.-Nr. 8279SA der Fa. Gibco-BRL)

Digoxigenin-dUTP (hergestellt und markiert nach Beispiel 4 und 14).

³⁵S-dATP (Amersham-Buchler, Best. Nr. SJ1304), spezifische Aktivität 1200 Curie/mmol

Hybridisierungs- und Waschbedingungen gemäß J. mol. Biol. 3 (1961) 585 ff.

Zellen der genannten Zelllinien werden auf HCl gereinigten (0,1 N HCl, 10 min bei 100 °C in phosphate buffered saline (PBS)) gewaschen und anschließend auf UV-bestrahlten Objektträgern in Plastikkulturschalen ausgesät. Als Kulturmedium wurde hierzu minimal essential medium (MEM) mit 5 % an fötalem Kälberserum verwendet (MEM, PBS, SSC vgl. Science 130 (1959) 432 ff).

Nach Ausbildung eines halbkonfluenten Zellrasens wurden die Objektträger den Kulturschalen entnommen und mehrfach mit PBS gewaschen.

Dann schloß sich die Fixierung der Zellen auf der Glasoberfläche an. Hierzu wurde 4 % Paraformaldehyd verwendet (5 min bei Raumtemperatur, dann Waschen in 2 x SSC).

Die Hybridisierung erfolgte unter silikonisierten Deckgläsern. Hierzu wurde die DNA der HPV-Probe in Hybridisierungslösung (nicht-radioaktive Probe: 20 ng/Hybridisierungsbereich, Isotop-markierte Probe: 3 ng mit fünfmal 10⁵ cpM/Hybridisierungsbereich) auf den Zellrasen gegeben. (Die Vorhybridisierung erfolgte wie in Beispiel 19 beschrieben). Nach Auflegen des Deckgläschens wurde dieses versiegelt (z.B. mit Fixogum[®] von Marabu). Die Denaturierung der DNA in den Zellen und der DNA-Probe erfolgte dann durch Auflegen

des Objektträgers auf einen Heizofen für 3 bis 5 Minuten. Hierbei wurde eine Temperatur von 90 - 92° C auf dem Objektträger mittels eines Temperaturfühlers gemessen. Die Objektträger werden dann kurz auf Eis gelegt und anschließend über Nacht in einer feuchten Kammer (2 x SSC) inkubiert.

Nach Ablösen der Deckgläser wurde mit 2 x SSC, 0,1 % SDS, 2 x 15 min bei Raumtemperatur und 0,2 x SSC, 0,1 % SDS, 2 x 15 min bei 52° C gewaschen.

Im Falle der nicht-radioaktiven Systeme wurde dann nach Beispiel 21 bzw. im Biotinsystem (vgl. Arbeitsanleitung des BRL-Kits: Blocken mit 3 % Rinderserumalbumin, Zugabe eines Konjugats aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase sowie Substratmischung) gearbeitet. Im Digoxigenin-System wurde entsprechend Beispiel 21 verfahren. Die Enzymreaktion wurde bis zu 48 Stunden beobachtet.

Als Probe wurde Digoxigenin-markiertes Subfragment des Genoms von HPV TYP 18 (PNAS 80 (1983) 3812-3815, New Engl. J. of Med. 310 (1984) 880-883) verwendet. Es zeigt sich, daß mit dem Digoxigenin-System in HeLa-Zellen deutlich die Anfärbung des Kernbereichs zu erkennen ist. Nach DNase-Verdau vor Hybridisierung bleibt nur ein geringer unspezifischer Hintergrund. Das Weglassen der markierten Probe führt zu keiner Anfärbung. Auch bei SiHa-Zellen, die lediglich zwei bis drei Kopien HPV pro Zelle ins Genom integriert haben, gelingt der HPV-Nachweis über Nacht. Auch bei diesen Zellen wird vorwiegend der Kernbereich angefärbt. DNase-Verdau führt zu geringem Hintergrund. Das Weglassen der markierten Probe führt zu ungefärbten Zellen.

Anders ist die Situation bei Verwendung von Biotin-markierten Proben. Das Biotin-System führt zwar zu einer schwachen Anfärbung von HeLa-Zellen mit SiHa-Zellen, wird jedoch vorwiegend unspezifisch das Cytosol angefärbt. Der Kernbereich ist nur wenig angefärbt. Die Unspezifität des Biotin-Nachweissystems zeigt sich auch darin, daß die gleiche Anfärbung des Cytosols auch ohne Biotin-markierter Probe, jedoch nach Zugabe allein eines Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugats und des entsprechenden Farbstoff-Systems erfolgt.

Mit radioaktiv markierten ³⁵S-Proben ist zwar der HPV-Nachweis in HeLa- und SiHa-Zellen möglich, jedoch ist dazu eine Autoradiographie von 2 - 3 Wochen notwendig.

Bei in situ-Hybridisierung an fixierten Zellen hat das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber dem Verfahren unter Verwendung von radioaktiv markierten Proben den Vorteil der Zeitersparnis gegenüber dem Verfahren unter Verwendung von Biotin-markierten Proben den Vorteil der höheren Sensitivität und deutlich höherer Spezifität.

Neben in situ-Hybridisierung in fixierten Zellen ist mit dem erfindungsgemäßen System ebenfalls ein HPV-Nachweis in Gewebsabstrichen, z.B. in HPV-infiziertem Gewebe aus dem Vagina-Bereich, möglich.

Beispiel 25

Nachweis von SUP 6 tRNA durch Colony-Hybridisierung

Ein 750 bp BamHI-Fragment von SUP 6 tRNA (Science 209 (1978), 1396-1460) aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde in pUC19 (Gene 133 (1985), 103-119) kloniert und in *E.coli* HB 101 (DSM 1607) transformiert. Als Kontrolle wurde der pUC19-Vektor allein in *E.coli* HB 101 transformiert. Danach wurden abwechselnd Insert-haltige Bakterien neben Kontroll-Transformanten auf Nitrocellulose aufgestrichen. Nach Inkubation für 5 Stunden bei 37° C auf Agarplatten mit Nährmedium wurden die *E.coli*-Zellen alkalisch behandelt, gewaschen und die freigesetzte DNA durch cross-linking bei 354 nm die Membran fixiert. Anschließend erfolgte wiederum Waschen für 3 Stunden bei 50° C, Vorhybridisierung und Hybridisierung analog Beispiel 19 mit Digoxigenin-markiertem SUP tRNA-BamHI-Fragmenten (Herstellung analog Beispiel 14). Für die anschließende Detektion ist eine Stunde ausreichend.

Die Insert-haltigen Bakterien geben jeweils eindeutige Signale, die Kontrolltransformanten werden nicht detektiert. Längere Detektionszeiten verstärken die positiven Signale, die Kontrolltransformanten bleiben jedoch auch bei längerer Detektion hintergrundfrei.

Beispiel 26

In situ-Hybridisierung von Lambda Plaques

Lambda gt10-Phagen (Mol.Gen.Genet. 150 (1977), 53) mit einer vollständigen cDNA von humaner

Urokinase als Insert wurden auf Indikatorplatten inkubiert, so daß auf einer Platte ca. 500 einzelne Plaques sichtbar waren. Auf eine weitere Platte wurde eine Mischung aus Urokinase-Rekombinaten und einer gleichen Phagenmenge, bestehend aus einer heterogenen Population einer Genbank ausplattiert. Diese Platte diente als Kontrolle, denn nur die Urokinase-Rekombinanten sollten mit einer Urokinase cDNA als Hybridisierungsprobe ein positives Signal geben. Von allen Platten wurden zwei Nitrocellulose-Abklatsche, wie in Science 198 (1977), 180 beschrieben, hergestellt und hybridisiert.

Die Probe wurde dadurch hergestellt, daß 12 µg eines Plasmids, welches die humane Urokinase cDNA enthält, mit PstI verdaut wurde. Dabei entsteht ein 1,1 Kb-Teil fragment der cDNA, welches durch Elektrophorese eluiert wurde (Ausbeute etwas 2 µg).

Die Markierung des Teilfragments erfolgt analog Beispiel 14. Die Vorhybridisierung und Hybridisierung der Filter erfolgt analog Beispiel 19. Die weiteren Detektionsschritte erfolgen analog Beispiel 21.

Es zeigte sich, daß die Filter der Platten, die nur Urokinase-rekombinante Phagen enthielten, ein positives Signal für alle Plaques gaben, die auch im zweiten Abklatsch gut sichtbar waren. Im Falle der Mischung waren lediglich so viele positive Signale zu sehen, wie rekombinante Phagen zugesetzt wurden. Die Lambda-Phagen mit anderen Inserts gaben kein positives Signal.

Beispiel 27

Northern-blot-Hybridisierung (Nachweis von Actin-mRNA aus Hefe)

Das erfindungsgemäße System ist auch zum sensitiven und spezifischen Nachweis von RNA in Northern-blots geeignet. Um dies zu demonstrieren, wurde Actin-mRNA in Gesamt-Hefe-RNA (Saccharomyces cerevisiae) nachgewiesen. Das Actin-Gen (PNAS 77 (1980), 3912-3916) besteht aus zwei Exons und einem Intron. Bei der Transkription entsteht zunächst Vorläufer-mRNA (1679 Basen). Nach Capping, Splicing und Polyadenylierung (Durchführung wie in Meth. in Enzymol. 65 (1980) 380-391 und PNAS USA 77 (1980) 5201-5205 beschrieben) entsteht gereifte mRNA mit einer Länge von ca. 1400 Basen (1370 Basen + PolyA).

Danach erfolgt Transfer auf Nitrocellulose wie in T. Maniatis et al. "Molecular cloning" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982) beschrieben. Die Vor- und Haupthybridisierung und Detektion (18 Stunden) erfolgt wie in Beispiel 19 beschrieben. Zur Detektion wurde eine Digoxigenin-markierte Actin-spezifische Probe, welche aus einem 2,3 kb-Actin-EcoRI/HindIII-Fragment des Actin-Gens bestand, verwendet.

Beispiel 28

Nachweis von Hepatitis B-Virus (HBV) in Humanseren durch Slot-blot-Analyse

Das Hepatitis B-Virus hat ein ca. 3,2 kb großes zirkuläres Genom, das aus zwei linearen komplementären Strängen aufgebaut ist. Das 3'-Ende des einen Strangs ist variabel. Die 5'-Enden der beiden komplementären Stränge sind gegeneinander versetzt. Für den HBV-Nachweis auf DNA-Basis wurde ein Digoxigenin-markiertes 1,8 kb BamHI-Fragment (Herstellung nach Beispiel 14) als Probe verwendet, das den doppelsträngigen Bereich Core-Antigen sowie Teile des Prae-S1-, Prae-S2- und X-Antigens enthält (Position 1,4 - 3,2 kb). Parallel zum Digoxigeninnachweis wurden Biotin - (vgl. Beispiel 24) und ³²P-markierte Proben (Markierung analog Arbeitsanweisung des BRL-Kits, vgl. Beispiel 24) verwendet.

Die untersuchten Humanseren sind auf Basis der immunologischen Marker HB_sAg, HB_eAg, Anti-HB_s und Anti-HB_e als positiv oder negativ eingestuft.

Serum-Vorbereitung:

Für eine Doppelbestimmung werden 100 µl zentrifugiertes Serum mit 300 µl 0,5 M NaOH versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird erneut 5 min zentrifugiert. Jeweils 200 µl des Überstands werden in einen Kammschlitz des Minifolt[®]-Geräts pipettiert und dann Vakuum angelegt.

Vorbereitung des Nylon-Filters:

Biodyne Nylon-Membran (1,2 µm Porengröße) (Pall Bio Support Div. Glen Cove, N.Y.) wird auf Kammergröße zugeschnitten und folgendermaßen vorbereitet:

- 5 min in destilliertem Wasser eingelegt
- 15 min in 10 x SSC
- 5 min unter Wärmelampe auf Whatman[®]-Papier getrocknet.
- Auflegen auf 10 x SSC-getränktes Whatman[®]-Papier und Einlegen in Minifold[®]-Apparatur.
- Die Probensammelplatte wird dann auf das Filter gelegt, festgeklemt, und anschließend werden die
- 10 Seren gespottet.

Weiterbehandlung des Filters:

- 15 Die Filter werden aus dem Minifold[®]-Gerät entnommen und für jeweils 5 min auf 10 x SSC, 5 x SSC und 1 x SSC aufgelegt. Anschließend wird unter einer Wärmelampe getrocknet und für 2 Stunden bei 80 °C im Vakuum gebacken.

Die Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgt analog Beispiel 19.

- 20 Die Herstellung der radioaktiven Probe erfolgt wie in der Arbeitsanleitung des Sp6/T7 Transcription kit von BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Best.-Nr. 999644, beschrieben.

Praehybridisierung, Hybridisierung, Waschen und Entwickeln für die ³²p-Probe erfolgt wie in Maniatis (supra) beschrieben.

- 25 Es zeigt sich, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Signale im Slot-blot nur mit den positiven, nicht jedoch mit den negativen Seren erhalten werden. Die Kontrollreaktionen mit immunisiertem Serum sind ebenfalls negativ. Der Vergleich mit entsprechendem radioaktiven Nachweis zeigt analoge Spezifität. Im Biotin-System dagegen ist deutlich erhöhter Hintergrund zu sehen.

- Der HPV-Nachweis mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist sehr empfindlich. In einer Verdünnungsreihe können HPV-Sequenzen bis zu einer Serumverdünnung von 10⁻⁴ bis 10⁻⁵ nachgewiesen werden. Dies entspricht der Sensitivität im radioaktiven System. Die entsprechenden Negativ-Seren ergeben im
- 30 nicht-radioaktiven System bei keiner Verdünnung ein Signal. Auch in der Verdünnungsreihe ist im Biotinsystem ein deutlicher Hintergrund zu sehen.

Beispiel 29

- 35 Digoxigenin-markiertes dUTP wird in der polymerase chain reaction (PCR, analog EP-A 0200362) zur Markierung amplifizierter DNA eingesetzt.

Als sample wird verwendet Plasmid pBR 322

Primer 1: 5'-GCTCCCTCGTGCCTCTCCTGT-3'

- 40 Primer 2: 5'-CCGCTACATACCTCGCTCTGC-3'

- 10 pg sample, 300 ng primer 1, 300 ng primer 2, je 1 mmol/l dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,1 mmol/l Digoxigenin-dUTP in 67 mmol/l Tris-HCl pH 8,8, 6,7 mmol/l MgCl₂, 16,6 mmol/l Ammoniumsulfat, 1 mmol/l Mercaptoethanol und 0,17 mg/ml Rinderserumalbumin werden 2 min bei 95 °C denaturiert und 3 min bei 40 °C hybridisiert. Danach werden 6 U Thermus aquaticus DNA-Polymerase zugegeben und 3 min bei
- 45 65 °C inkubiert (Polymerisierung). (Das Volumen der Reaktion beträgt 50 Mikroliter, die Konzentrationsangaben beziehen sich auf dieses Reaktionsvolumen). Insgesamt wurden 25 Zyklen (Denaturierung, Hybridisierung, Polymerisierung) durchgeführt.

- Anschließend werden je 1/5 der Reaktionsansätze in 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt und nach der Methode von Southern (J.Mol.Biol. 98 (1975) 503) auf Nylonmembranen (z.B. Hybond-N, Amersham)
- 50 transferiert. Alternativ werden Verdünnungen von 1:10 bis 1:10⁵ auf Nylonmembranen aufgetropft und fixiert. Blockierung der Filter, Konjugatreaktionen und Färbung werden analog Beispiel 21 durchgeführt.

Ansprüche

- 55 1. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren definierter Sequenz durch Hybridisierung mit einer komplementären Nukleinsäure-Sonde, die über eine chemische Verbindung mindestens ein Hapten als Markierung gebunden enthält, dadurch gekennzeichnet, daß man als Hapten ein Steroid verwendet, das

an mindestens eine Position der Nukleinsäure-Sonde, die nicht an der Wasserstoffbrückenbildung beteiligt ist, über eine Brücke von mindestens 4 Atomen Länge gebunden ist und die hybridisierte Sonde über einen seinerseits markierten Anti-Hapten-Antikörper nachweist.

2. Verfahren nach einem der Ansprüche 1,

5 **dadurch gekennzeichnet,**

daß man als Steroid Digoxigenin oder Digoxin verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß das Hapten über die Brücke an die C₅-Position von Uracil oder Cytosin oder an die C₈-Position von
10 Adenin oder Guanin gebunden ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß das Hapten über die Brücke an die 2'-Position der Ribose gebunden ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

15 **dadurch gekennzeichnet,**

daß eine Nukleinsäure-Sonde verwendet wird, deren Hapten in die Nukleinsäure-Sonde enzymatisch mit Hilfe von DNA-Polymerasen, RNA-Polymerasen, Reversen Transkriptasen oder Terminalen Transferasen und entsprechenden Hapten-modifizierten Desoxy- oder Ribonukleosidtriphosphat-Substraten eingebaut wurde.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

dadurch gekennzeichnet,

daß eine Nukleinsäure-Sonde verwendet wird, deren Hapten in die Nukleinsäure-Sonde photochemisch mit Hilfe von Photo-Hapten eingebaut wurde.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

25 **dadurch gekennzeichnet,**

daß eine Nukleinsäure-Sonde verwendet wird, deren Hapten in die Nukleinsäure-Sonde chemisch im Rahmen der Oligo-Desoxyribonukleotid-Synthese durch Einbau geschützter, mit substituierbaren Aminofunktionen modifizierter Nukleosidphosphoramidite und -nach Entfernung der Schutzgruppen - durch Umsetzung des modifizierten Oligo-Desoxyribonukleotids mit aktivierten Estern, Amiden oder Ethern des Haptens
30 eingebaut wurde.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,

dadurch gekennzeichnet,

daß als Markierung des Anti-Hapten-Antikörpers eine Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung oder (Bio-)Lumineszenzmarkierung verwendet wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

35 **dadurch gekennzeichnet,**

daß die nachzuweisenden Nukleinsäuren durch in situ-Hybridisierung in auf Objektträgern fixierten Zellen nachgewiesen werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,

40 **dadurch gekennzeichnet,**

daß die nachzuweisenden Nukleinsäuren durch in situ-Hybridisierung in Gewebsabstrichen nachgewiesen werden.

45

50

55

FIG. 1

Dig-11(16)-dUTP

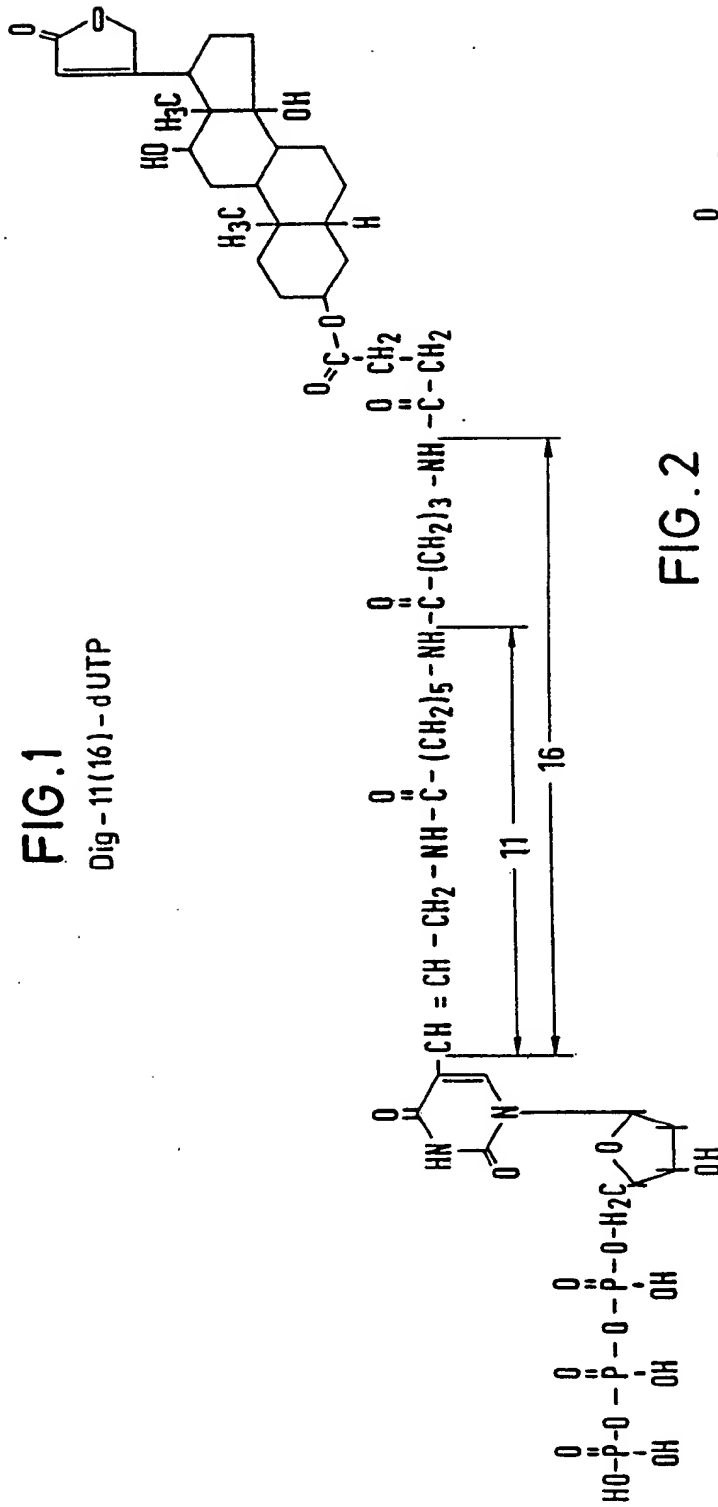


FIG. 2

Photodigoxigenin

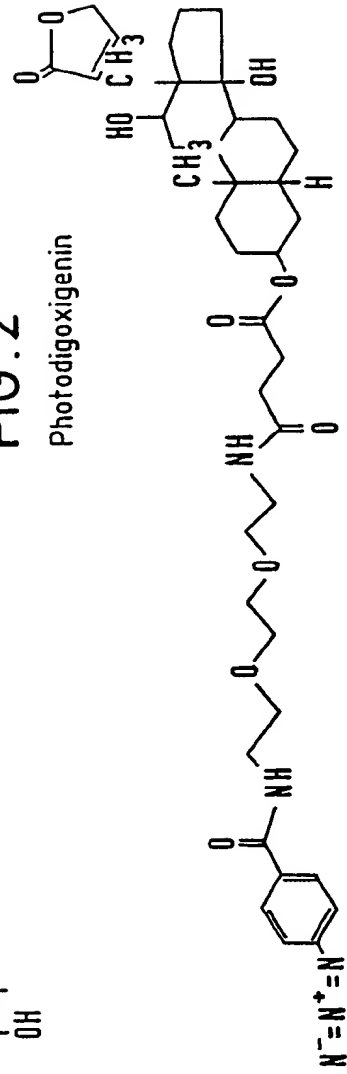
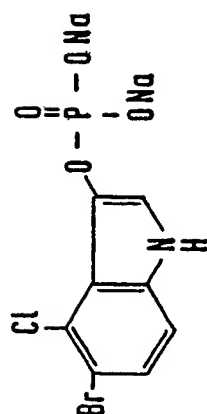
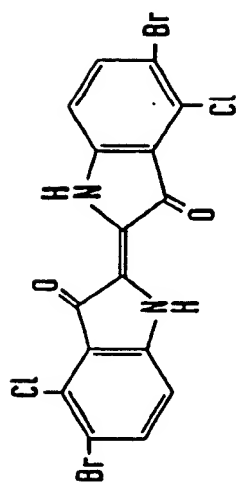


FIG. 3

5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat - Na₂



farblos



blau

Phosphatase
↓
Oxidation

zu FIG. 3

Nitrotetrazolium Blue (NBT)
 Syn.: 3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylene)-bis-(5-phenyl-2-(4-nitrophenyl)-tetrazolium chloride)

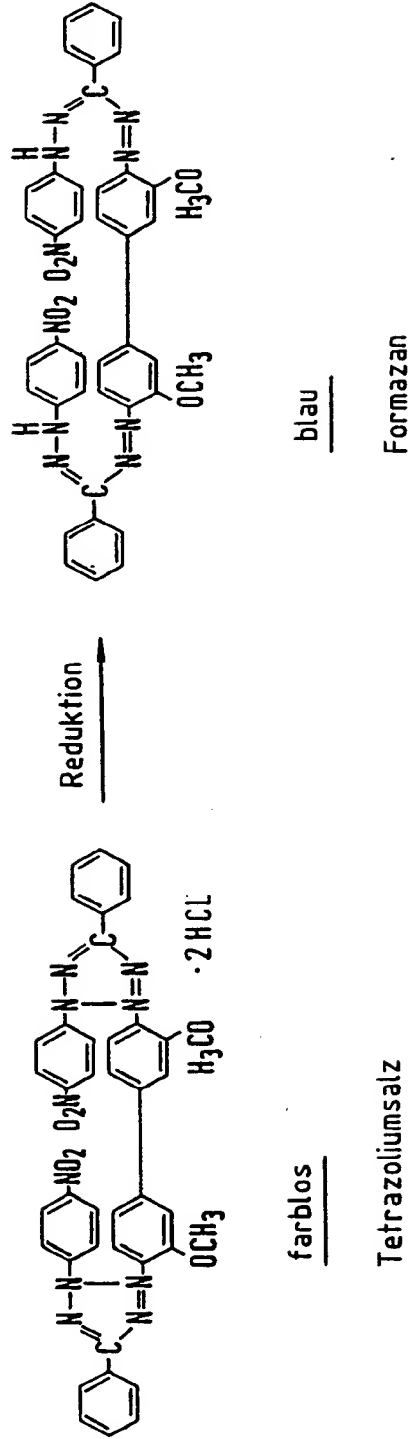
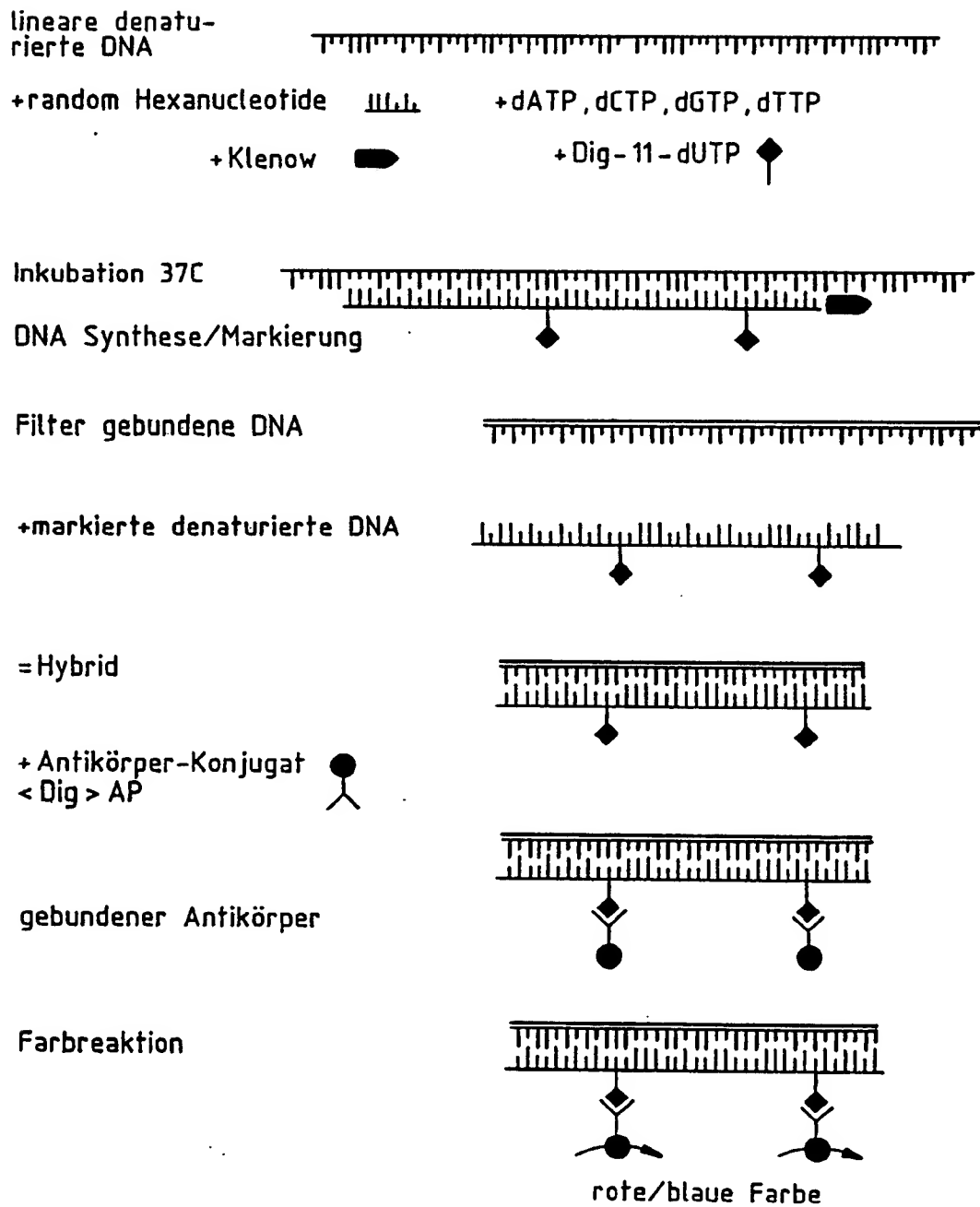


FIG. 4

Hochsensitiver DNA-Nachweis



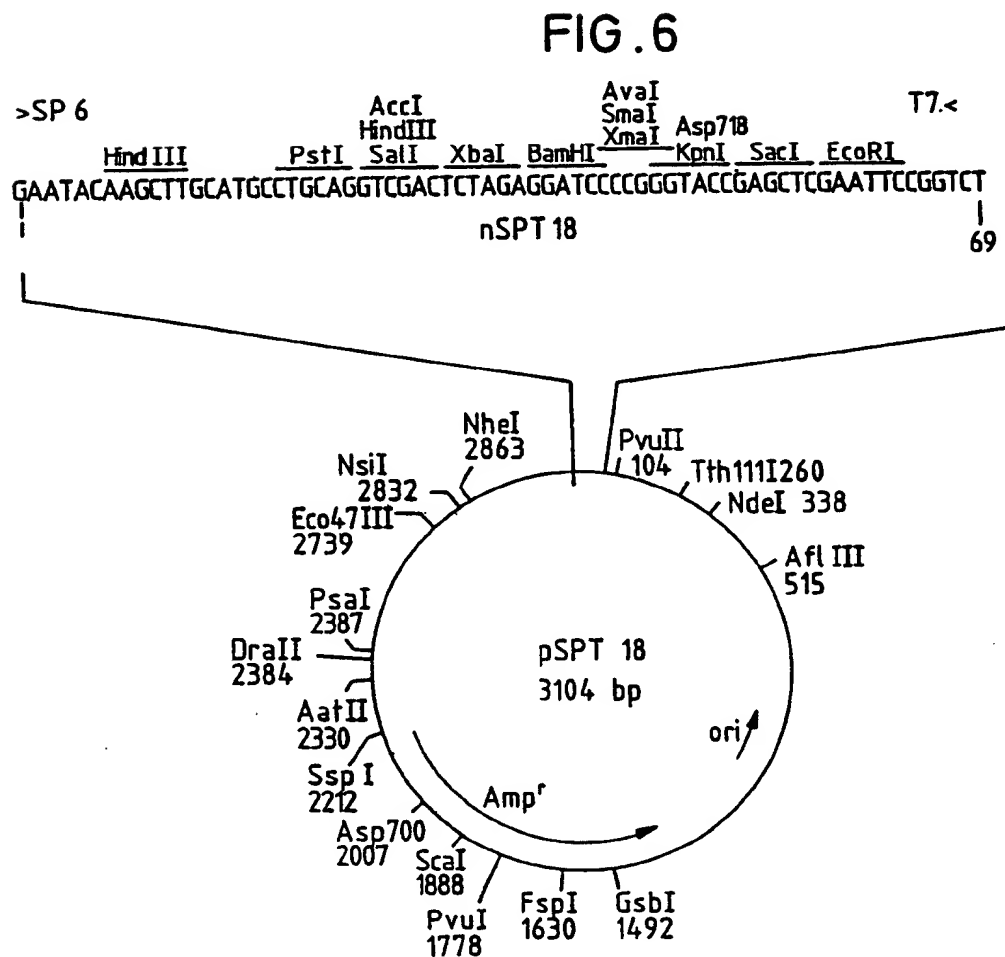
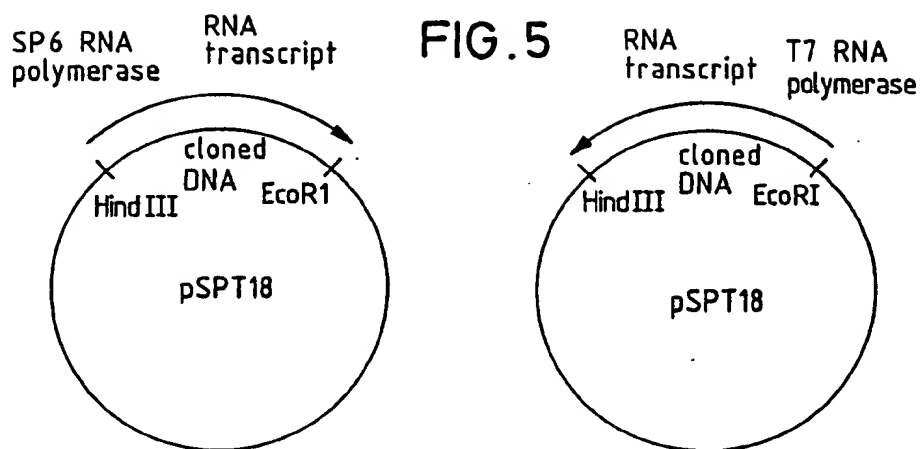


FIG. 7

Syntheschema für Digoxigenin-3-hemisuccinat-/
N'-(4-azidobenzoyl)/-8-amino-3,6-dioxaoctylamid (Photodigoxigenin)

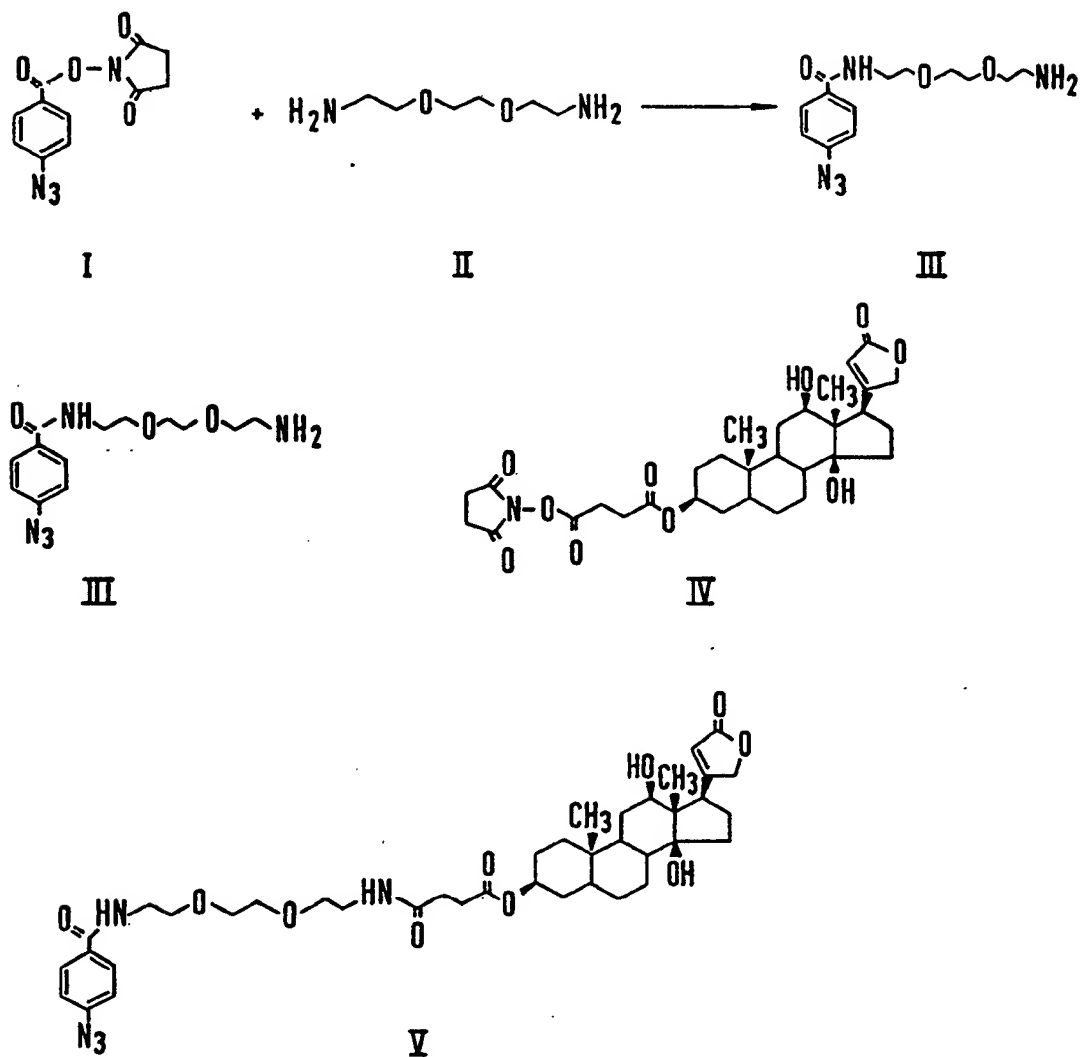


FIG. 9

Vergleich der Sensitivitäten einer erfindungsgemäßen enzymatischen Markierung (A) mit einer bekannten chemischen Markierung (B)

FIG. 9A

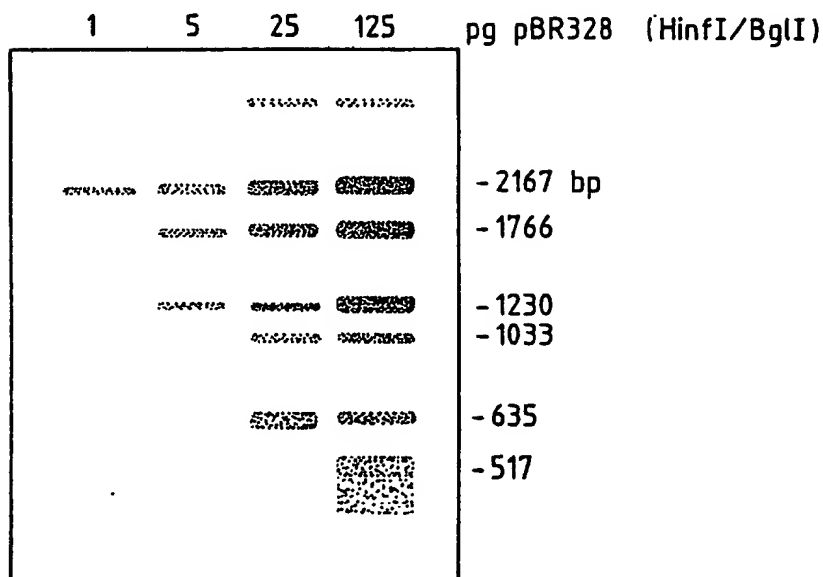


FIG. 9B

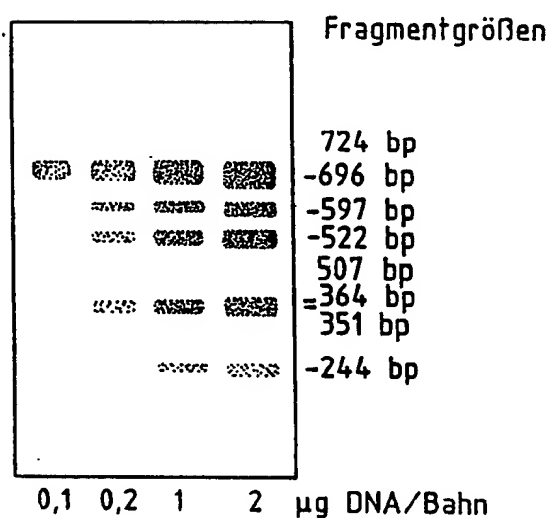


FIG. 10

DNA-Sequenz(A) und Restriktionskarte(B) des Plasmids pSPT18

FIG. 10A

```

1  GAATACAAGC TTGCATGCCT GCAGGTCGAC TCTAGAGGAT CCCC GGGTAC
51  CGAGCTCGAA TTCCGGTCTC CCTATAGTCA GTCGTATTAA TTTCCATAAG
101 CCAGCTGGGC CTCGCCGCTT TCGGTGATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA
151 TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC
201 AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT GTTGGGGGGT GTCGGGGCGC
251 AGCCATGAGC CAGTCACGTA GCGATAGCGG AGTGTATATA CTGGCTTAAC
301 TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGCGGTGTGA
351 AATACCGCAC AGATGCCGTA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTTCCG
401 CTTCCTCGCT CACTGACTCG CTGGGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG
451 GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAAATACG TTATCCACAG AATCAGCGGA
501 TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC
551 GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCGG CCCCCGTGAC
601 GAGCATCACA AAAATCGAGC CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG
651 ACTATAAAGA TACCAGGCGT TTCCCCCTCG AAGCTCCCTC GTGGCTCTC
701 CTGTTCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCTT TCTCCCTTCG
751 GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA ATGCTCAGCG TGTAGGTATC TCAGTTCGGT
801 GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTCAGC
851 CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
901 AGACACGACT TATCGGCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG
951 AGCGAGGTAT GTAGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT
1001 ACGGCTAGAC TAGAAGGACA GTATTGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA
1051 GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTGT TGATCCGGCA AACAAACCAC
1101 CGCTCGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA
1151 AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
1201 CAGTGAACG AAAACTCAG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA

```

Fortsetzung **FIG.10A**

1251 AAGGATCTTC ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA
1301 TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC
1351 AGTGAGGCAG CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTTAT CCATAGTTGC
1401 CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACCGGAGGGC TTACCATCTG
1451 GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGACACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT
1501 TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCGGAGCGCA GAAGTGGTCC
1551 TGCAACTTTA TCCGCCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTCG CGGGAAGCTA
1601 GAGTAAAGTAG TTCCCCAGTT AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT
1651 ACAGGCATCG TGGTGTACAG CTCGTGCTTT GGTATGGCTT CATTGAGCTC
1701 CGGTTCCCAA CGATCAAGGC CAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA
1751 AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTGAGAAG TAAGTTGGCC
1801 GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT
1851 CATGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT
1901 CATTCTGAGA ATAGTGTATG CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA
1951 ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAT
2001 TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA
2051 GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
2101 TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC
2151 CGCAAAAAAG GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT
2201 TCCTTTTTCA ATATTATTGA AGCATTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC
2251 GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTTCCGGG
2301 CACATTTCCT CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA
2351 TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTCGCG
2401 CGTTTCGGTG ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC
2451 GGTACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCGCGTCAGG
2501 GCGCGTCAGC GGGTGTTCGG GGGTGTCCGG GCTGGCTTAA CTATGCCGCA
2551 TCAGAGCAGA TTGTAAGTGA AGTGACCAT ATCGACGCTC TCCCTTATGC
2601 GACTCCTGCA TTAGGAAGCA GCGCAGTAGT AGGTTGAGGC CGTTGAGCAC
2651 CGCCGCCGCA AGGAATGGTG CATGCAAGGA GATGGCGCCC AACAGTCCCC
2701 CGGCCACGGG CCTGCCACCA TACCCACGCC GAAACAAGCG CTCATGAGCC
2751 CGAAGTGGGG AGGCGGATCT TCGGCATCGG TGATGTGGGG GATATAGGGG
2801 CCAGCAACCG CACCTGTGGC GCGGCTGATG CCGGCCACGA TCGTCCGGG

Fortsetzung **FIG. 10A**

2851 GTAGAGGATC TGGCTAGCGA TGACCCTGCT GATTGGTTCC CTGACCATTI
2901 CCGGGTGCGG GACGGCGTTA CCAGAACTC AGAAGGTTCC TCCAACCAA
2951 CCGACTCTGA CGGCAGTTTA CGAGAGAGAT GATAGGGTCT GCTTCAGTAA
3001 GCCAGATGCT ACACAATTAG GCTTGTACAT ATTGTCGTTA GAACGGGGCT
3051 ACAATTAATA CATAACCTTA TGTATCATAC ACATACGATT TAGGTGACAC
3101 TATA

FIG. 10B

pSPT18 Restriktionskarte

Zahl der Schnittstellen

Enzyme		Position der Schnittstellen
<i>Ava</i> II	2	1546 1768
<i>Bgl</i> I	2	106 1528
<i>Eco</i> 311	2	71 1469
<i>Fln</i> I	2	2699 2908
<i>Hgl</i> EII	2	335 1096
<i>Sph</i> I	2	17 2674
<i>Apy</i> I	3	543 664 677
<i>Ban</i> II	3	56 2750 2764
<i>Bbe</i> I	3	2688 2801 2822
<i>Cfr</i> 101	3	1488 2821 2830
<i>Dra</i> I	3	1274 1293 1985
<i>Eae</i> I	3	1796 2702 2832
<i>Eco</i> 57I	3	1063 2075 2977
<i>Eco</i> RII	3	541 662 675
<i>Gcl</i> II	3	1796 2701 2832
<i>Hae</i> I	3	528 539 991
<i>Mme</i> I	3	730 914 2968
<i>Nar</i> I	3	2685 2798 2819
<i>Tth</i> 111II	3	1105 1112 1144
<i>Apa</i> LI	4	331 829 2075 2572
<i>Bsp</i> HI	4	1235 2243 2348 2742
<i>Aha</i> II	5	1945 2327 2685 2798 2819
<i>Ban</i> I	5	46 1356 2684 2797 2818
<i>Fok</i> I	5	201 1374 1555 1842 2485
<i>Mae</i> I	5	32 1010 1263 1598 2864
<i>Mae</i> II	5	266 1218 1634 2007 2327
<i>Nsp</i> I	5	17 152 519 2436 2674
<i>Rsa</i> I	5	48 323 1888 2564 3026
<i>Sec</i> I	5	41 42 675 2698 2704
Enzyme, die nicht spalten		
<i>Afl</i> II	<i>Apa</i> I	<i>Asu</i> II
<i>Bbv</i> II	<i>Bcl</i> I	<i>Bgl</i> II
<i>Bss</i> HII	<i>Bst</i> EII	<i>Bst</i> XI
<i>Eco</i> RV	<i>Eco</i> R124	<i>Esp</i> I
<i>Nco</i> I	<i>Not</i> I	<i>Nru</i> I
<i>Pma</i> CI	<i>Ppu</i> MI	<i>Rsr</i> II
<i>Sfi</i> I	<i>Sna</i> I	<i>Sna</i> BI
<i>Stu</i> I	<i>Sty</i> I	<i>Xho</i> I
		<i>Avr</i> II
		<i>Bam</i> I
		<i>Cla</i> I
		<i>Hpa</i> I
		<i>Nsi</i> I
		<i>Sac</i> II
		<i>Spe</i> I
		<i>Xma</i> III
		<i>Bal</i> I
		<i>Bsp</i> MII
		<i>Dra</i> III
		<i>Mlu</i> I
		<i>Pfi</i> MI
		<i>Sau</i> I
		<i>Spl</i> I



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 0482

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL4)
L	CHEMICAL ABSTRACTS Band 110, Nr. 5, 30. Januar 1989, Seite 159, Zusammenfassung Nr. 34785g; R. SCHAEFER et al.: "DNA fingerprinting using non-radioactive oligonucleotide probes specific for simple repeats"; & NUCLEIC ACIDS RES. Band 16, Nr. 19, 1988, Seite 9344 (Kat. X,P) ---	1,2,7,8	C 12 Q 1/68 C 07 H 21/00
L	BIOLOGICAL ABSTRACTS Band 87, 1989, Zusammenfassung Nr. 87049454; H.B.J. HEILES et al.: "In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses HPV 16-18 in HeLa and SHIA cells"; & BIOTECHNIQUES, Band 6, Nr. 10, 1988, Seiten 978-981 (Kat. X,P) ---	1,2,10	
L	BIOLOGICAL ABSTRACTS RRM Band 36, 1989, Zusammenfassung Nr. 36065581; S. DOOLEY et al.: "Rapid detection of DNA-binding factors using protein-blotting and digoxigenin-dutp marked probes"; & NUCLEIC ACIDS RES., Band 16, Nr. 24, 1988, Seite 11839 (Kat. X,P) ---	1	
D,Y	EP-A-0 173 251 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * ganzes Dokument *	1	
A	---	8	
D,Y	EP-A-0 063 879 (YALE UNIVERSITY) * ganzes Dokument *	1	
A	---	3,5,7,8	
	---	-/-	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 21-03-1989	Prüfer DE KOK A.J.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Seite 2

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 0482

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
D,A	VIROLOGY Band 126, 1983, Seiten 32-50; New York; D.J. BRIGATI et al.: "Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes". * ganzes Dokument *	1-3,8- 10	
D,A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH Band 13, Nr. 3, 1985, Seiten 745-761, London; A.C. FORSTER et al.: "Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin". * ganzes Dokument *	1-6,8	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
BERLIN	21-03-1989	DE KOK A.J.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	